UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY
APR 4 '57

# EXPERIENTIA

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
P. HUBER · R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA
Basel Lausanne Bern Zürich
Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL
SUISSE – SCHWEIZ – SVIZZERA – SWITZERLAND

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

H. NACHTSHEIM: Mutation und Phänokopie bei Säugetier und Mensch (Ihre theoretische und praktische Bedeutung für Genetik und Eugenik) . . . . . 57

*Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports*

J. LINDER und E. LÜSCHER: Über die Beeinflussung des Dunkelstromes bei RCA-Photomultiplieren . . . . . 69
M. V. BHATT: Abnormal Beckmann Rearrangements. A Mechanism of the Semmler Reaction . . . . . 70
G. LEANDRI and P. REBORA: On the Sulphur Analogue of Azoxy-Benzene: Azo-Thio-Benzene . . . . . 71
M. PROTIVA, J. O. JÍLEK, E. ADLEROVÁ und L. NOVÁK: Neue Totalsynthese einer razemischen Doisynolsäure . . . 71
A. FIECHTER und U. VETSCH: Die Wasserbestimmung in Zellmaterial von *Saccharomyces cerevisiae* nach KARL FISCHER . . . . . 72
L. NEIPP, W. KUNZ et R. MEIER: Spécificité de l'action antiphage de substances synthétiques . . . . . 74
H. BRUNNER, G. KUSCHINSKY, O. MÜNCHOW und G. PETERS: Änderungen des Elektrolytgehaltes von Erythrozyten und Plasma bei nephrektomierten Ratten . . . . . 75
B. D. JANKOVIĆ, D. T. KANAZIR, D. MANČIĆ, and M. PETROVIĆ: Changes in Antigenicity of Rats Spleen Cells Nuclei Resulting from Total-Body X-Irradiation . . . . . 76
C. V. RAMAKRISHNAN: Amino Acid Composition of Crude and Germinated Guarseed Flour Protein (*Cyamopsis Psoralioides*) . . . . . 78
G. WERZ: Eiweissvermehrung in ein- und zweikernigen Systemen von *Acetabularia* . . . . . 79
R. ŽÁK, E. GUTMANN, and G. VRBOVÁ: Quantitative Changes of Muscle Proteins After Stimulation of the Muscle 80
F. DE RITIS, G. GIUSTI, and M. COLTORTI: Serum Phosphoglucomutase Activity in Human Virus Hepatitis . . . 81
V. ROSÍVAL und F. V. SELECKÝ: Jahreszeitliche Schwankungen der Blutgerinnung beim Hunde . . . . . 82
H. BERGQUIST: Mitotic Activity During Successive Migrations in the Diencephalon of Chick Embryos . . . . . 84
R. A. EDGREN: On the Endocrine Basis of Sexual Differences in Hexobarbital Sleeping-Time in Rats . . . . . 86
V. ERSPAMER and C. CICERI: Action of Reserpine on the 5-Hydroxytryptamine (Enteramine) Biosynthesis and Metabolism in Dogs and Rats . . . . . 87
A. H. SCHEIN: Absence of Uricolytic Activity in Human Parotid Glands . . . . . 89
D. SCHNEIDER: Electrophysiological Investigation on the Antennal Receptors of the Silk Moth During Chemical and Mechanical Stimulation . . . . . 89
B. RYBAK, M. BÉCUWE et P. BÉCUWE: Premiers résultats d'analyse fonctionnelle électro-biochimique sur l'oreillette isolée étalée de *Scyllium canicula* . . . . . 91
D. F. COLE and J. F. MEREDITH: A Theoretical Consideration of the Interaction of Antidiuretic Hormones and Sodium Retaining Hormones in the Kidney . . . . . 94
E. M. HODNETT, CH. F. FELDMAN, and J. J. FLYNN, Jr.: Preparation of Radioactive Water (Pro Laboratorio) . . 96

*Informations - Informationen - Informazioni - Notes*

Nova: Journal of Insect Physiology . . . . . 96

# Elektronenmikroskope
# Elektronendiffraktographen
# Hochspannungsoszillographen

## Trüb, Täuber · Zürich


*Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia XIII/2*

Ciba AG., Basel
Contina A. G., Vaduz
Ganz & Co., Zürich
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel
E. Mettler, Zürich
Pergamon Press Ltd., London
Sandoz A. G., Basel
Trüb, Täuber & Co., Zürich

*Die EXPERIENTIA kann in folgenden Ländern durch die Post abonniert werden:*
*Des abonnements pour EXPERIENTIA peuvent être commandés près des bureaux de poste des pays suivants:*

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Italien | Belgien, Luxemburg | Dänemark | Schweden | Portugal |
| Deutschland | Holland | Norwegen | Finnland | Marokko |


L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an Fr. 44.– pour la Suisse; pour l'étranger Fr. 56.–. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 44.–, im Ausland sFr. 56.–.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, ½ Seite Fr. 132.–, ¼ Seite Fr. 77.–. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 44.– per la Svizzera; all'estero sfr. 56.–. I prezzi vanno intesi in valuta svizzera.

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription by inland mail is fr. 44.–; other countries sfr. 56.–. Prices in Swiss currency.

Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, ½ page fr. 132.–, ¼ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.



*Copyright 1957 by Birkhäuser Verlag, Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstrasse 19, Telephon (061) 235820; Telegrammadresse: Edita Basel*



*Printed in Switzerland by Birkhäuser AG., Basel*

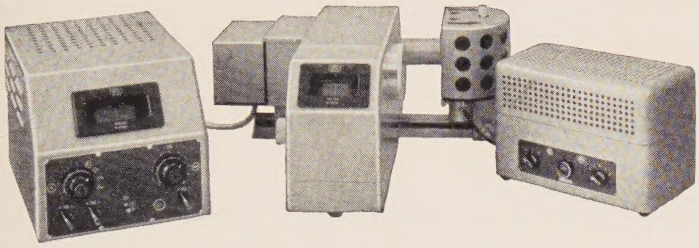
**Das neue**

# ZEISS

**Quarz-Spektralphotometer**

**PMQ II**

**erfüllt Ihre Wünsche!**



Bitte verlangen Sie den ausführlichen Prospekt Nr. 05–657/E

Zuverlässige Beratung und Service durch eigenes Fachpersonal

CARL ZEISS Generalvertretung für die Schweiz:

Beachten Sie die Vorteile:

- **Direktanzeige** des Meßwertes (ohne Einbuße an Meßgenauigkeit), dadurch Übersicht über das Absorptionsspektrum und Zeitgewinn.
- **Vollständiger Netzbetrieb.** Keine Akkumulatorwartung; jederzeit betriebsbereit.
- **Impulslicht – Wechselstromverfahren.** Dunkelstromeinstellung fällt weg und ebenso der feuchtigkeitsempfindliche Gleichstromverstärker (keine Trocknungspatronen mehr). Meßbereich: 200 bis 1000 mμ, nachträgliche Erweiterung bis 2500 mμ möglich.
- **Höchste Empfindlichkeit** durch Sekundärelektronen-Vervielfacher 1 P28.
- **Einfach-Monochromator** mit Quarz- oder Glasoptik oder **Doppel-Monochromator** mit auswechselbarer Quarz- und Glasoptik nach Wunsch.
- **Mikroküvetten** in Vorbereitung, welche ohne Beschneidung des Spaltbildes verwendet werden können, d.h. kein zusätzlicher Lichtverlust.

**GANZ & CO**

BAHNHOFSTR. 40
TEL. (051) 23 97 73

*Zürich*



# Der Schlüssel zu jedem Rechenproblem!

**CURTA**

**Rechenmaschine**

Die CURTA ist eine handliche und zugleich vollwertige Rechenmaschine, die alle 4 Grundrechenarten und sämtliche darauf aufbauenden Rechnungen ausführt. Sie liefert im Handumdrehen kommagenaue Ergebnisse. Ihr Produktenwerk fasst bis zu 15stellige Zahlen.

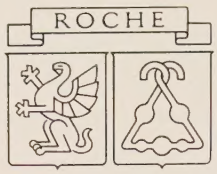
Die CURTA-Rechenmaschine ist klein genug, um ohne zu stören an jedem Arbeitsplatz, wo genau gerechnet werden soll, stets in Griffnähe zu stehen.

Zahlreiche öffentliche und private Forschungsinstitute, Universitätslehrstühle und Wissenschafter in über 30 Ländern verwenden CURTA-Rechenmaschinen für Labor- und Konstruktionsberechnungen, statistische Auswertungen und als individuelles Recheninstrument für ihre Forschungsarbeiten.

Der Präzisionsmechanismus der CURTA besteht ausschliesslich aus Metallen, die gegen Korrosion geschützt sind, und er hat sich unter den härtesten Arbeitsbedingungen in der Arktis, in den Tropen und an Himalaya-Expeditionen bestens bewährt.

Auch für Sie und Ihre verantwortlichen Mitarbeiter wird der Einsatz von CURTA-Rechenmaschinen lohnen. Wir veranlassen gern eine unverbindliche Erprobung der CURTA bei Ihnen durch unsere nächste Vertriebsstelle.

**C O N T I N A A. G.**
Vaduz (Liechtenstein)




Anerkennung und Vertrauen in die Erzeugnisse eines pharmazeutischen Hauses kommen nicht von ungefähr.

Jahrzehnte der Forschung, der Erfahrung und des Fortschritts haben den Arzneimitteln, die den Namen ‚Roche' tragen, jene Güte verliehen, für die sie bekannt sind, und die Beliebtheit, deren sie sich allgemein erfreuen.

# ROCHE

F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO · AKTIENGESELLSCHAFT · BASEL

EXPERIENTIA

Vol. XIII - Fasc. 2 Pag. 57–96 15. II. 1957

# Mutation und Phänokopie bei Säugetier und Mensch

## Ihre theoretische und praktische Bedeutung für Genetik und Eugenik

Dem Pathologen ROBERT RÖSSLE* zum 80. Geburtstag am 19. August 1956 gewidmet

Von HANS NACHTSHEIM**, Berlin-Dahlem

### 1. *Der Begriff Phänokopie*

Im Jahre 1935 prägte GOLDSCHMIDT auf Grund von Experimenten an Drosophila, der Taufliege, den Begriff Phänokopie. Er versteht darunter eine durch bestimmte Aussenfaktoren gewonnene Modifikation, die einer bei der gleichen Spezies beobachteten Mutation entspricht oder doch ähnelt. Bei Drosophila können, so stellte GOLDSCHMIDT fest, fast alle Mutationstypen, selbst die seltensten und extremsten, auch als nichterbliche Phänokopien entstehen. Das phänokopierende Agens kann sehr verschiedener Natur sein. Hitzeschocks, Kälteschocks, Röntgen- und andere Strahlen, chemische Substanzen mannigfacher Art in Atmosphäre oder Nahrung können Phänokopien auslösen, wobei im allgemeinen keine spezifische Wirkung bestimmter Faktoren festzustellen ist.

Die Arbeiten GOLDSCHMIDTS haben Anlass zu vielen weiteren Untersuchungen gegeben, nicht nur bei Drosophila, sondern auch bei zahlreichen anderen Objekten, Insekten, Vögeln, Säugetieren, bis hinauf zum Menschen. Dabei war eigentlich die Tatsache an sich keineswegs neu, nur der Begriff. Ein paar Beispiele für ältere Beobachtungen.

STOCKARD[1] konnte 1907 bei Fischen (*Fundulus heteroclitus*) Cyclopie erzeugen, indem er dem Seewasser, in dem sich die Fische entwickelten, Magnesiumchlorid zusetzte. Er verglich die von ihm erhaltenen Monstren mit den beim Menschen gelegentlich beobachteten Embryopathien ähnlicher Art. ADELMANN[2] machte 1934 Versuche mit dem gleichen Ergebnis, indem er *Amblystoma punctatum*, einen Molch, sich unter dem Einfluss von Magnesium- und Lithiumchlorid entwickeln liess. Dass man Cyclopie bei Amphibien aber auch auf rein mechanischem Wege erhalten kann, bewies SPEMANN[3] schon 1904 mit seinen Durchschnürungsversuchen an Triton. Indem er die Triton-Eier auf dem Zwei-Zellen-Stadium durchschnürte, erhielt er diese Fehlbildung.

Nun ist allerdings erbliche Cyclopie bisher weder bei Fischen und Amphibien noch beim Menschen bekannt, jedoch beobachtete man sie als Mutation bei Kaninchen und Meerschweinchen. Das berechtigt zu dem Schluss, dass sie auch bei den genannten Objekten mutativ auftreten kann. Eine Reihe von Missbildungen des Menschen kannte man auch schon vor GOLDSCHMIDT als Mutation und als Phänokopie, so Mikrophthalmie und Anophthalmie, Spina bifida, Polydaktylie.

Das eindrucksvollste Beispiel einer Phänokopie ist aber unseres Erachtens die vollständige Umwandlung eines Individuums mit genotypischer Geschlechtsbestimmung in das andere Geschlecht. Es entspricht diese Phänokopie zwar nicht ganz der GOLDSCHMIDTschen Definition, da nicht ein einzelnes Mutationsmerkmal phänokopiert wird, sondern ein ganzer erblicher Merkmalskomplex bei gleichbleibendem Genotypus durch Aussenfaktoren in sein Gegenteil gekehrt wird – geradezu eine Phänokopie *katexochen*.

1923 teilte CREW[4] Beobachtungen an einer Buff-Orpington-Henne mit, die 3½ Jahre eine gute Legerin und Mutter zahlreicher Kücken war. Von diesem Zeitpunkte ab ging in ihr eine Umwandlung ins männliche Geschlecht vor sich. Kamm, Kehllappen und Sporen vergrösserten sich, das Gefieder wurde vermännlicht in Form und Farbe, das Tier begann zu krähen und Hennen zu treten. Schliesslich wurde es mit einer jungfräulichen Henne gleicher Rasse in Klausur gehalten, deckte sie täglich, die Prüfung der Ejakulate in der Kloake der Henne zeigte lebende Spermatozoen, das ehemalige Muttertier lieferte als Vatertier Kücken beiderlei Geschlechts, die sich bei der genetischen Prüfung miteinander als normale Orpingtons erwiesen. Die *post-mortem*-Untersuchung des umgewandelten Tieres ergab ein durch Tuberkulose ausser Funktion gesetztes und degeneriertes Ovar. Auf *beiden* Seiten hatten sich Hoden entwickelt sowie paarige Vasa deferentia. Die Hoden zeigten sich auch histologisch als funktionsfähig, wenn auch als in einer Phase von verminderter Aktivität befindlich.

* *Redaktionelle Anmerkung.* Am 21. November 1956 ist Herr Prof. RÖSSLE in Berlin verstorben. Die Experientia-Leser erinnern sich dankbar an seinen Aufsatz: «Warum sterben so wenig Menschen eines natürlichen Todes?» Exper. *4*, 295 (1948). *H. M.*

** Aus dem Max-Planck-Institut für vergleichende Erbbiologie und Erbpathologie in Berlin-Dahlem. – Nach einem Vortrag an der Universität Nagoya (Japan) am 17. September 1956.

[1] CH. R. STOCKARD, Roux'Arch. Entw.-Mech. *23*, 249 (1907).

[2] H. B. ADELMANN, J. exper. Zool. *67*, 217 (1934).

[3] H. SPEMANN, Zool. Jb. *7*, Suppl. 429 (1904).

[4] F. A. E. CREW, Proc. roy. Soc. [B] *95*, 256 (1923).

Das am längsten bekannte Beispiel einer Phänokopie beim Menschen ist aber wohl die Epilepsie in ihrer symptomatischen Form, ein Beispiel, an dem die unterschiedliche Bedeutung der erblichen und der nichterblichen Erscheinung für die Eugenik schon Mitte des 18. Jahrhunderts klar aufgezeigt wurde. Im Jahre 1757 erliess der schwedische König Adolf Friedrich das sogenannte Epileptiker-Gesetz, das älteste eugenische Gesetz in Schweden und allgemein, das den an erblicher Fallsucht Leidenden die Ehe verbietet. Es erscheint mir interessant genug, den wichtigsten Passus des Textes wörtlich zu zitieren. Die Übersetzung, die ich Professor ESSEN-MÖLLER, dem Psychiater der Universität Lund, verdanke, gibt die schwerfällige und umständliche Sprache amtlicher Schriftsätze jener Zeit treffend wieder. Es heisst in dem Gesetz:

«Weil, laut einem diesbezüglichen untertänigen Gutachten des Collegium Medicum, die erfahrensten Ärzte von ältesten Zeiten her darüber einig sind, dass eine echte Fallsucht, Epilepsia idiopathica genannt, von Eltern auf Kinder und Kindeskinder fortgepflanzt wird, und die tägliche Erfahrung zeigt, dass es kaum einen mit dieser schweren Krankheit Behafteten gibt, wenn nicht einer seiner Vorfahren väterlicher- oder mütterlicherseits von der Fallsucht gequält gewesen ist, dass aber diese Fallsucht nicht zu verwechseln ist mit der sogenannten Epilepsia sympathica oder Konvulsionen und Zuckungen, die aus anderen Ursachen stammen und von einem geschickten Arzt erkannt und geheilt werden können und somit nicht auf die Kinder fortgepflanzt werden und daher der Eheschliessung nicht hinderlich sein können,

deshalb finden Wir, dass das einzige Mittel, um die Fallsucht nach und nach auszurotten, darin besteht, den damit behafteten Personen, sei es Mann oder Frau, die Eheschliessung gänzlich zu verbieten.»

Das Epileptiker-Gesetz ist heute noch in Schweden gültig. 1920 hat man eine Revision vorgenommen, die indessen im wesentlichen darin bestand, dass man die Begriffe Epilepsia idiopathica und sympathica durch endogene und exogene Epilepsie ersetzte.

Um es also zu wiederholen: Phänokopie ist seit 1935 ein neuer Begriff, die zugrundeliegenden Tatsachen aber sind seit langem bekannt. Wie oft in der Wissenschaft, so wirkte indessen auch dieses Mal eine geschickte Begriffsbildung, eine gute Formulierung anregend; zahlreiche Arbeiten über Phänokopien waren das Ergebnis.

Man unterschied echte und falsche Phänokopien. Echte Phänokopien sind solche, bei denen die Wirkung des exogenen Faktors unmittelbar an die Stelle der Genwirkung tritt, das heisst auf der gleichen Phase der Entwicklung in diese eingreift und den gleichen Ablauf der Entwicklung zur Folge hat. In wie vielen bzw. wie wenigen Fällen aber ist es möglich, die Parallele wirklich vom Anfang bis zum Ende zu verfolgen? HADORN[5] führt in seinem ausgezeichneten Buch über die Letalfaktoren eine Reihe echter Phänokopien auf. Aber sind sie wirklich alle «echt»? Die Unterscheidung von echter und falscher Phänokopie erscheint recht problematisch.

HADORN sagt: «Mutation und Phänokopie können zu identischen Phänen führen, auch wenn sie in durchaus verschiedenen Phasen der Entwicklung eingreifen.» Er fährt fort: «In solchen sicher *häufig* verwirklichten Fällen hat das Phänokopie-Experiment keine direkte Beziehung zur Wirkung der Mutation.» Ich möchte sagen, dass diese Fälle sogar *sehr* häufig sind, dass aber meines Erachtens die *falschen* Phänokopien keinesfalls ein geringeres theoretisches und praktisches Interesse beanspruchen als die echten.

Noch aus einem anderen Grunde ist die Unterscheidung von echten und falschen Phänokopien problematisch. Der eben zitierte Satz HADORNS über die identischen Phäne gilt auch, wenn wir das Wort Phänokopie durch Mutation ersetzen, wenn wir also Mutationen miteinander vergleichen. Man hat von mimetischen Genen und mimetischen Mutationen gesprochen. Man könnte auch von einem Gegenstück zur Phänokopie, von einer *Genokopie* reden*. Sicher gibt es auch unter den Genokopien «echte» und «falsche». Beim Kaninchen konnten wir drei genisch verschiedene Kurzhaarmutationen nachweisen. Sie stimmen im Phän völlig überein. Die anfängliche Vermutung, dass das eine Gen (für Deutsch Kurzhaar) etwas welligeres Haar produziere als die beiden anderen, erwies sich als irrig; die stärkere Wellung ist auf die Gengesellschaft bzw. ein bestimmtes Gen in dieser zurückzuführen, das sich auch mit den beiden anderen Kurzhaar-Genen verbinden lässt und dann die gleiche Wirkung ausübt.

Ähnlich ist es auch mit den drei Typen von Keratose beim Kaninchen, Pelzlosigkeit genannt, die ebenfalls genisch verschieden sind, aber phänisch nahezu übereinstimmen. Freilich ist hier doch schon ein gewisser Unterschied feststellbar. Der Grad der Keratose und damit des Fehlens des Wollhaarkleides ist verschieden. Wenn auch alle drei Typen eine gewisse Variationsbreite des Merkmales zeigen, wobei sich die drei Variationskurven stark überschneiden, so liegen doch ihre Gipfel an verschiedener Stelle. Haben wir hier nun echte oder falsche Genokopien vor uns? Der experi-

[5] E. HADORN, *Letalfaktoren in ihrer Bedeutung für Erbpathologie und Genphysiologie der Entwicklung* (Stuttgart 1955).

* Der Begriff Genokopie ist von GLOOR und SCHINZ[6] allerdings bereits anderweitig benutzt worden, nach meiner Meinung freilich ganz überflüssigerweise. Sie wollen von Genokopie sprechen, wenn ein Erbleiden erst *nach* experimenteller Erzeugung einer exogen bedingten Missbildung aufgefunden wird. Nun, solange wir nur die Modifikation kennen, ist ein zweiter Begriff überflüssig; tritt aber das gleiche Phän als Mutation auf, so sollte man darüber keinen Prioritätsstreit entfachen, wer wen kopiert, und schon der Einheitlichkeit wegen und aus praktischen Gründen auch dann von Mutation und Phänokopie sprechen.

[6] H. GLOOR und H. R. SCHINZ, Dtsch. med. Wschr. *75*, 911 (1950).

mentelle Beweis, ob es die zugeordneten Gene selbst sind oder die jeweilige Gengesellschaft, die die Unterschiede produzieren, ist äusserst mühsam und umständlich zu erbringen. Aber selbst wenn die Unterschiede *nicht* an der Gengesellschaft liegen, wäre es möglich, dass die drei Typen durch vollkommen gleichwertige Gene, aber etwas verschiedene Allele dieser Gene bedingt werden.

Das beste Beispiel für mimetische Gene und Mutationen bietet uns die Hausmaus. Wir kennen hier bereits mehr als ein Dutzend Gene, die das sogenannte Choreatiker-Syndrom, das Tanzen, hervorrufen. Aber obwohl die Zwangsbewegungen im Kreise das Leitsymptom aller Typen sind, hat doch nahezu jeder Typ seine Besonderheiten im Tanz; man kann sagen: so viele Chorea-Gene, so viele verschiedene Tänze. Das Choreatiker-Syndrom besteht ausser dem ebengenannten Leitsymptom in der Regel noch aus zwei weiteren Symptomen, den stereotypen Kopfbewegungen, dem Schütteln und der Taubheit. Aber es gibt doch auch Choreatikertypen, die nicht taub sind, und andere, bei denen das Kopfschütteln fehlt. Bei wieder anderen Typen treten zu diesen weitere Symptome, die augenscheinlich mit dem Tanzen unmittelbar nichts zu tun haben, wie Kurzschwänzigkeit oder Syndaktylie. Ob die Brachyurie bzw. die Syndaktylie eine pleiotrope Wirkung des betreffenden Chorea-Gens darstellt oder ob eng mit diesem gekoppelte Gene wirksam sind, muss dahingestellt bleiben. Jedenfalls ist es bisher nicht gelungen, die Merkmalskomplexe zu trennen; das gesamte Syndrom mendelt jeweils einfachrezessiv.

Eine eingehende vergleichende anatomische und histopathologische Untersuchung an Gehirn und Gehörorgan aller Choreatikertypen der Maus steht zwar noch aus, doch lässt sich heute schon auf Grund der vorliegenden Befunde sagen, dass offenbar die Defekte und Fehlbildungen am Gehirn sehr verschiedener Natur sein und doch alle zu einem ähnlichen Krankheitsbild, eben dem der Chorea, führen können. Hier kann kein Zweifel bestehen, dass es sich um falsche Genokopien handelt.

In welchem Masse uns die Übereinstimmung im Krankheitsbild eine ätiologische Einheitlichkeit vorzutäuschen vermag, zeigen die neuesten Ergebnisse der Hämophilieforschung beim Menschen. Die *Bluterkrankheit* galt bis vor kurzem geradezu als Schulbeispiel eines regelmässig durch ein und dasselbe, im *X*-Chromosom lokalisierte rezessive Gen bedingten Erbleidens, das stets unter dem gleichen klinischen Bild, dem Mangel der Gerinnungsfähigkeit des Blutes, auftrat. Höchstens dass der Grad der Gerinnungsunfähigkeit in einzelnen Familien etwas verschieden war, was Haldane[7] veranlasste, die Existenz zweier Allele des Gens mit verschiedener Expressivität anzunehmen. Das Bild änderte sich indessen, als vor wenigen Jahren Koller, Krüsi und Luchsinger[8] entdeckten, dass man bei einer von ihnen untersuchten Blutersippe mit nur wenig verlangsamter Blutgerinnung den Defekt dieses Blutes durch Mischung mit dem anderer typischer Bluter völlig beheben kann. Damit war klar, dass in den beiderlei Blutersippen verschiedene Defekte der Blutgerinnung gegeben sind, die sich gegenseitig aufzuheben vermögen. Beide Hämophilien werden geschlechtsgebunden-rezessiv vererbt; man bezeichnet sie heute als Hämophilie A oder klassische Hämophilie, und Hämophilie B, im angelsächsischen Schrifttum auch nach der Natur der Mangelerscheinungen als AHF-deficiency und PTC-deficiency*. Ob es sich bei den beiden Hämophilien A und B um verschiedene Allele eines Gens handelt, oder ob vielleicht, wie Vogel[9] erstmalig vermutet hat, ein compound gene vorliegt und Pseudoallelie, muss zunächst dahingestellt bleiben. Jedenfalls hat die Entdeckung von Koller und Mitarbeitern der Blutgerinnungsforschung einen ausserordentlich starken Auftrieb gegeben. Wir kennen heute eine ganze Reihe bei der Blutgerinnung mitwirkender Faktoren, die mutativ abgeändert werden und dann das Bild der Hämophilie hervorrufen können. Es sind dabei offenbar auch autosomale Gene beteiligt. So ist die Bluterkrankheit heute zum schönsten Beispiel für eine Genwirkkette beim Menschen geworden, gleichzeitig aber auch zum Beispiel dafür, wie vorsichtig man bei der Entscheidung der Frage «echte oder falsche Genokopie» sein muss.

Einen ähnlichen Weg wie bei der Hämophilie scheint die Forschung bei der Wasserharnruhr des Menschen, dem Diabetes insipidus, zu gehen. Das Leiden wird meist einfach-dominant vererbt, doch kommt auch geschlechtsgebunden-rezessiver Erbgang vor. In jüngster Zeit hat nun Forssman[10] in schwedischen Familien *zwei* geschlechtsgebunden-rezessiv erbliche Typen nachgewiesen, die sich in ihrer Symptomatologie nicht unterscheiden. Während aber die Merkmalsträger des einen Typs auf das antidiuretische Hormon des Hypophysenhinterlappens, das Pitressin, in der aus der Therapie des Diabetes insipidus bekannten Weise durch Normalisierung der Harn- und Kochsalzausscheidung reagieren, spricht der andere Typ auf Pitressin nicht an. Auch hier offenbar Änderungen verschiedener Glieder einer Genwirkkette, auch hier liegt bei der Lokalisation beider Gene im *X*-Chromosom die Annahme nahe, dass Pseudoallelie gegeben ist. Freilich sollen die beiden Formen funktionell verschieden – die eine zentral, die andere nephrogen – bedingt sein.

[7] J. B. S. Haldane, J. Genet. *31*, 317 (1935).

[8] F. Koller, G. Krüsi und P. Luchsinger, Schweiz. med. Wschr. *80*, 1101 (1950).

* AHF = antihemophilic factor, PTC = plasma-thromboplastin-component. Die Abkürzung PTC ist insofern nicht gerade glücklich, als die gleichen Buchstaben auch die Abkürzung für phenylthiocarbamide bedeuten. Die Fähigkeit, die Bitterstoffe im Phenylthioharnstoff zu schmecken, ist bekanntlich ein in neuerer Zeit vielfach geprüftes Erbmerkmal des Menschen.

[9] F. Vogel, Blut *1*, 91 (1955).

[10] H. Forssmann, Amer. J. hum. Genet. *7*, 21 (1955).

Fassen wir also zusammen: Es gibt echte und falsche Phänokopien, es gibt aber ebenso auch echte und falsche Genokopien (mimetische Mutationen). Die Entscheidung, ob echt oder falsch, ist indessen äusserst schwierig, und bei vielen als echt betrachteten Phänokopien dürfte es sich bei genauerer Analyse erweisen, dass die Entstehungsgeschichte doch eine andere ist als die der zum Vergleich herangezogenen Mutation. Ebenso aber ist es möglich, dass ein als falsche Phänokopie betrachtetes Phän sich einer Genokopie der zunächst zum Vergleich herangezogenen Mutation gegenüber als echte Phänokopie erweist.

An Hand einiger Beispiele, vornehmlich aus dem eigenen Arbeitskreis, sollen nun einige spezielle Fragen der Phänokopieforschung noch etwas eingehender erörtert werden.

### 2. *Die Unterscheidungsmöglichkeit von Mutation und Phänokopie am Phän*

Der wesentlichste Unterschied zwischen Mutation und Phänokopie ist, wie schon aus der Definition des Phänokopiebegriffes zu entnehmen, die Erblichkeit der einen, die Nichterblichkeit der anderen Erscheinung. Ist das Phän im Experiment unter der Wirkung exogener Faktoren während der Embryogenese gewonnen worden, so ist die Nichterblichkeit ohne weiteres klar und bedarf nicht noch eines züchterischen Beweises. Beim Säugetier indessen haben wir häufig und beim Menschen fast stets spontan entstandene Phäne vor uns, und da ist die Frage «erblich oder nichterblich» nicht so ohne weiteres zu beantworten. Zuchtversuche beim Säugetier sind zeitraubend und kostspielig und, zumal wenn die Merkmalsträger – wie bei vielen Missbildungen – zuchtuntauglich sind, sehr umständlich und wenig Erfolg versprechend. Beim Menschen liefern Familienuntersuchungen oftmals keine Information, die experimentelle Prüfung scheidet aus. Unter diesen Umständen sucht man nach Möglichkeiten, Mutation und Phänokopie bereits *am Phän* zu unterscheiden.

Zunächst einmal ist zu sagen: Die Beobachtungen an Säugetier und Mensch bestätigen im allgemeinen die Erfahrungen GOLDSCHMIDTS an Drosophila, dass fast alle Mutationstypen phänokopiert werden können. Immerhin gibt es Mutanten, die kaum je oder doch äusserst selten als Phänokopien auftreten. Und andererseits gibt es Embryopathien*, die bisher als erbliche Fehlbildungen weder bei Mensch noch Säugetier nachgewiesen worden sind.

* Der in den letzten Jahren aufgekommene Begriff Embryopathie wird hier und im folgenden für alle Schädigungen einer ganzen Entwicklungsperiode benutzt, ohne Rücksicht auf die Ätiologie, umfasst also Phänokopien und Mutationen. Einen so allgemeinen morphologischen Begriff auf die Phänokopien beschränken zu wollen, ist äusserst unzweckmässig, denn es würde dazu führen, dass das gleiche Phän bald als Embryopathie, bald nicht als solche zu bezeichnen wäre. Übrigens ist bei vielen Missbildungen, wie gesagt, von vornherein gar nicht zu entscheiden, ob sie erbbedingt sind oder nicht.

Zu den letztgenannten Embryopathien rechnet die grosse Gruppe der sehr mannigfaltig gestalteten *Doppelmissbildungen*, der Monstra duplicia oder Siamesischen Zwillinge, die beim Menschen und in fast

Abb. 1. Duplicitas posterior eines neugeborenen Kaninchens. Ausser dem Kopf vollständige Verdoppelung.

Abb. 2. Das gleiche Tier wie Abbildung 1 nach Färbung des Skelettes mit Alizarin.

allen Säugergruppen gelegentlich, wenn auch sehr selten, beobachtet werden. Abbildung 1 und 2** geben eine eigene Beobachtung dieser Art beim Kaninchen wieder. Meines Wissens ist weder bei Mensch noch Tier jemals eine familiäre Häufung derartiger Mon-

** Alle Abbildungen nach Originalen aus Arbeiten des Verfassers und seiner Mitarbeiter, zum Teil unveröffentlicht.

stren nachgewiesen worden. Es handelt sich offenbar um entwicklungsmechanische, vom Genotypus unabhängige Störungen der Embryogenese, die zu diesen Monstra führen. Die bereits erwähnten Durchschnürungsversuche SPEMANNS an Amphibien sind ein Modellversuch für die Entstehung derartiger Doppelbildungen.

Es liegt nahe, die Entstehung Siamesischer Zwillinge mit der Entstehung normaler *eineiiger* Zwillinge (*EZ*) zu vergleichen. In der Tat glaubt WENDT[11], einen Beitrag «zur erblichen Genese symmetrischer Doppelbildungen» geliefert zu haben. Er beschrieb einen Fall, in dem beide Eltern einer solchen Doppelbildung «durch Mehrlingsschwangerschaften in der Sippe belastet» waren. Bei der Häufigkeit von Zwillingsgeburten (mehr als 1%) bedeutet aber ein solches Zusammentreffen in einer grösseren Sippe nicht viel. Überdies haben die viel häufigeren *zweieiigen* Zwillinge (*ZZ*) mit den Doppelmissbildungen entstehungsmässig gar nichts zu tun, und ob bei der Bildung der *EZ* Gene überhaupt beteiligt sind, ist eine nach wie vor umstrittene Frage. Zudem besteht keinerlei Veranlassung, die Siamesischen Zwillinge als «missglückte *EZ*» zu betrachten, vielmehr kann als sicher gelten, dass die Bildung der Monstra duplicia erst in einem späteren Entwicklungsstadium einsetzt als die der *EZ*, bei denen es sich um eine Trennung von Blastomeren handelt.

Abb. 3. Diphallie bei einem Kaninchen-Rammler, 6 Monate alt, die Penes (durch Druck ausgestülpt) sind gleichmässig entwickelt und beide funktionsfähig.

Gewissermassen einen Ansatz zur Entstehung von Duplikationen und Zwillingen auf erblicher Grundlage hat GLUECKSOHN-SCHOENHEIMER[12] bei der Maus gefunden. Eine von CASPARI und DAVID[13] entdeckte Schwanzmutation, Kinky-tail, beruht auf der Wirkung eines semidominanten Gens, doch sind nur die Heterozygoten lebensfähig. Bei den Homozygoten treten kurz nach der Implantation der Embryonen, das heisst 7 Tage nach der Befruchtung, Doppelbildungen verschiedener Art und verschiedenen Grades auf, Individuen mit teilweiser oder vollständiger Verdoppelung der Achse, einzelner Organe und ihrer Teile. Alle diese

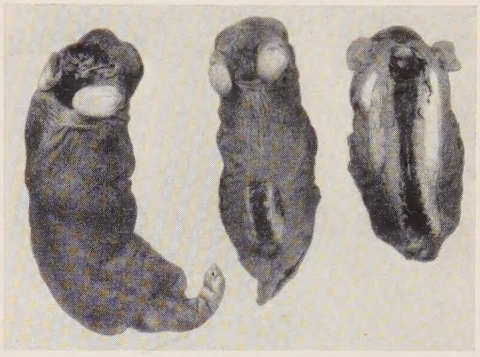


Abb. 4. Erbliche Spina bifida beim Kaninchen. Verschiedene Grade der Rachischisis bei 3 lebendgeborenen Jungen.

Doppelmissbildungen gehen indessen innerhalb von 2–3 Tagen zugrunde und werden resorbiert; kein derartiges Individuum erreichte bisher die Geburt.

Auch Verdoppelungen einzelner Organe sind im allgemeinen nichterblicher Natur. Bei dem Kaninchen

Abb. 5. Aus colchiciniertem Sperma gewonnenes neugeborenes Kaninchen mit nichterblicher Spina bifida in der Kreuzregion.

der Abbildung 3 ist eine *Diphallie* gegeben. Beide Begattungsglieder sind gleichmässig und «normal» entwickelt und funktionsfähig. Es wurden von diesem Rammler 21♂ Kinder gezogen und viele Hunderte von Enkelkindern und ferneren Nachkommen in engster Inzucht, ohne dass jemals wieder ein Tier mit einer ähnlichen Missbildung erschien.

[11] G. G. WENDT, Ärztl. Wschr. *1*, 457 (1947).

[12] SALOME GLUECKSOHN-SCHOENHEIMER, J. exper. Zool. *110*, 47 (1949).

[13] E. CASPARI and P. R. DAVID, J. Hered. *31*, 427 (1940).

Von Embryopathien, die sowohl als Mutation wie auch als Phänokopie auftreten, sei die *Spina bifida* genannt. Abbildung 4 zeigt drei lebend geborene Kaninchen mit verschiedenen Graden von Rachischisis aus einem Stamm, in dem die Spina bifida mutativ als rezessiv erbliches Merkmal auftrat. Bei dem Tier rechts liegt das ganze Rückenmark vom Kopf bis zum Schwanz offen da, bei den beiden anderen tritt es nur eine begrenzte Strecke zutage, bei dem mittleren Tier in der Sakralregion, bei dem linken unmittelbar hinter dem Kopf, an dem auch das Gehirn grossenteils freiliegt. Bei nachträglicher Präparation erwies sich, dass auch bei den beiden links wiedergegebenen Tieren die

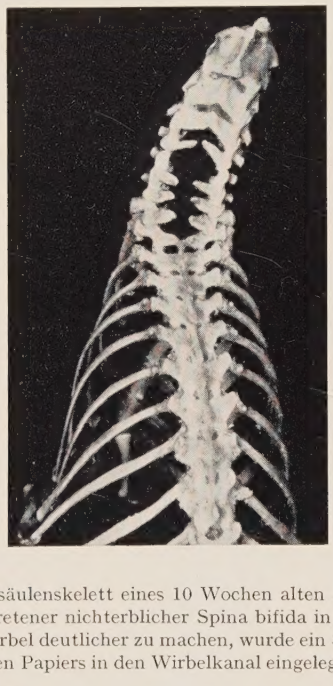


Abb. 6. Wirbelsäulenskelett eines 10 Wochen alten Kaninchens mit spontan aufgetretener nichterblicher Spina bifida in der Halsregion. Um die Spaltwirbel deutlicher zu machen, wurde ein Streifen schwarzen Papiers in den Wirbelkanal eingelegt.

Defekte sich unter der Haut als Spina bifida occulta fortsetzten. Demgegenüber handelt es sich in den beiden folgenden Fällen um phänokopisch entstandene Spinae bifidae. Das Neugeborene der Abbildung 5 ging aus mit Colchicin behandeltem und zu künstlicher Besamung benutztem Sperma hervor, während das Wirbelsäulenskelett der Abbildung 6 von einem 10 Wochen alt gewordenen Kaninchen mit spontan entstandener Phänokopie stammt. Beim lebenden Tier war in diesem letzten Falle der äussere Defekt noch kleiner als in Abbildung 5; es war zur Zeit der Geburt eine kleine, nicht nässende Blutblase im Nacken, die später verschwand, eine Spina bifida cystica, vorhanden, doch demonstriert das Wirbelsäulenskelett eine Spaltbildung, die sich über 5 Halswirbel erstreckt.

HADORN sagt: «Erbfaktoren wirken zuverlässiger und mit geringerer Manifestationsvariabilität als phänokopierende Agenzien.» Dies mag in manchen Fällen stimmen, ist aber keineswegs immer so, vielleicht nicht einmal die Regel. Die Variationsbreite der erblichen Spina bifida des Kaninchens zum Beispiel übertrifft die der nichterblichen Form bei weitem. Ausserdem sind Grad und Umfang des Defektes viel grösser. Eine totale Rachischisis, wie bei dem Tier rechts der Abbildung 4, sahen wir als Phänokopie beim Kaninchen nie. Freilich muss man sich vor voreiligen Schlüssen hüten. Es ist durchaus möglich, dass wir eines Tages eine mutativ neu entstandene Spina bifida erhalten, die den bisher beobachteten nichterblichen Formen im Phän mehr entspricht.

### 3. *Zur Frage der Häufigkeit der Phänokopien*

Das zahlenmässige Verhältnis der erblichen zu den nichterblichen Missbildungen ist zu verschiedenen Zeiten sehr verschieden eingeschätzt worden. Verfolgen wir den Wandel der Anschauungen am Beispiel der *Gliedmassenmissbildungen*, einem Formenkreis mit sehr grosser Variationsbreite, beginnend mit dem Fehlen einzelner oder aller Nägel an einzelnen oder allen 4 Gliedmassen über sämtliche Stufen der Extremitätenreduktion und vollständige Acheirie und Apodie, Hemimelie und Phokomelie bis zum vollkommenen Extremitätenschwund.

Zu Anfang des Jahrhunderts hat man das Fehlen der Extremitäten und von Extremitätenteilen fast stets durch exogen wirkende Faktoren zu erklären versucht, durch Fruchtwassermangel und -überschuss, durch Verklebungen, Verwachsungen, Strangbildungen des Amnions, durch amniogene Abschnürungen, fetale Amputationen, wie man es nannte. Später, in Deutschland vor allem nach 1933, wurden fast alle diese Missbildungen als endogen entstanden bzw. erblich bedingt betrachtet. «Selbst einseitiges und asymmetrisches Befallensein von Gliedmassen schliesst nicht die erbliche Bedingtheit aus, und sicher amniogene Missbildungen sind etwas ungeheuer Seltenes», sagt BAUER 1940 im Handbuch der Erbbiologie des Menschen. GRUBER fand unter 950 von ihm untersuchten Missbildungen nur 28 amniogen verbildete Früchte, und unter 12318 Geburten der Göttinger Universitäts-Frauenklinik aus 10 Jahren war nur eine sicher amniogene Missbildung.

In jüngster Zeit haben sich die Ansichten vielfach wieder gewandelt. So meint BÜCHNER[14], neue Untersuchungen hätten eindeutig ergeben, «dass den *peristatischen Faktoren*, beim menschlichen Embryo also den Einwirkungen im Bereiche des mütterlichen Eibettes die grössere Bedeutung in der Entstehung der Missbildungen und Missbildungskrankheiten zukommt». BÜCHNER äusserte sich GREBE[15] gegenüber sogar dahin, er halte angesichts der grösseren Häufigkeit nicht erblicher Missbildungen den Begriff Phänokopie für unzweckmässig. GREBE[16] hinwiederum tritt BÜCHNER

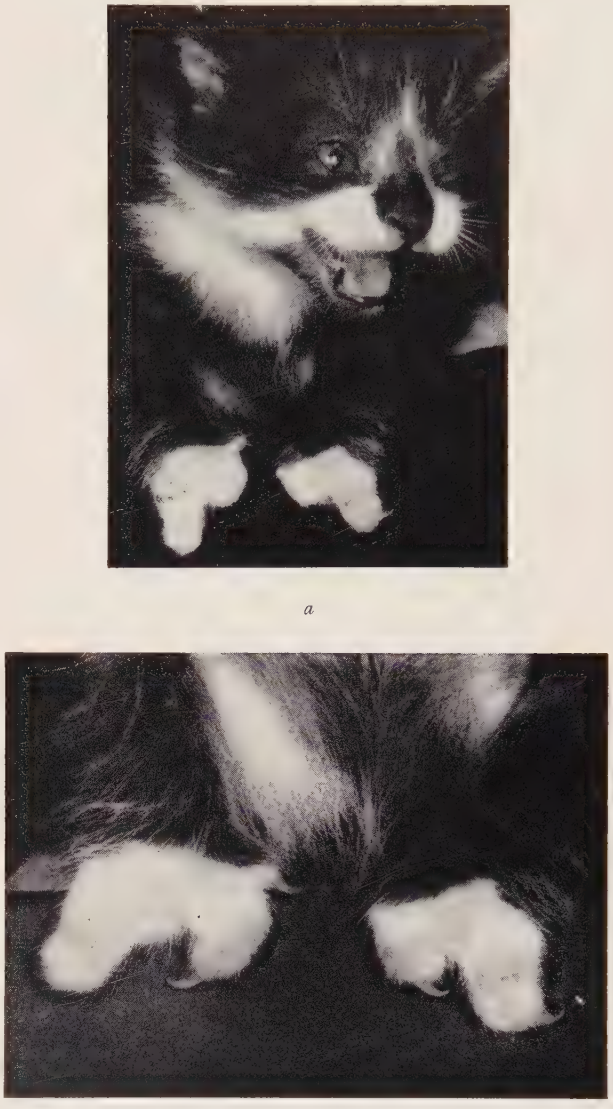
[14] F. BÜCHNER, Münchn. med. Wschr. *97*, 1673 (1955).
[15] H. GREBE, Folia hered. pathol. *2*, 99 (1953).
[16] H. GREBE, Acta genet. Med. Gemell. *3*, 197 (1954).

entgegen: «Im Bereich menschlicher Gliedmassenmissbildungen sind Phänokopien nur von untergeordneter Bedeutung. Sie sind jedoch in manchen Fällen entsprechend den bekannten tierexperimentellen Befunden möglich.»

Büchner weist zur Begründung seines Standpunktes auf die in den letzten 15 Jahren gemachten Beobachtungen über die Steigerung der Häufigkeit von Missbildungen bei Virusepidemien hin, sowie auf die Arbeiten seines Arbeitskreises zur Entstehung von Missbildungen durch Sauerstoffmangel im Tierversuch. So wichtig und wertvoll die dadurch gewonnenen Erkenntnisse aber auch sind, sie erlauben nach meiner Meinung doch keine Rückschlüsse auf das tatsächliche zahlenmässige Verhältnis der erblichen zu den nichterblichen Missbildungen beim Menschen. Bei der Röteln-Epidemie in Australien im Jahre 1941, von der die eben erwähnten Beobachtungen ihren Ausgang nahmen, sollen 90% der Kinder, deren Mütter während der ersten vier Schwangerschaftsmonate die Rubeola-Infektion durchgemacht hatten, mit Missbildungen geboren worden sein. Ich vermag nicht festzustellen, ob die zugrundeliegende Statistik einwandfrei ist (Interessantheitsauslese?). Jedenfalls ergaben die weiteren Untersuchungen, dass manche Viruskrankheiten – ausser Röteln, Masern, Windpocken, spinale Kinderlähmung, epidemische Hepatitis – zwar eine gewisse teratogene Wirkung auf die Frucht im frühen Entwicklungsstadium ausüben können, dass aber die Gefahr für das Kind doch bei weitem nicht so gross ist, wie die Beobachtungen in Australien zunächst vermuten liessen. Übrigens gibt auch Büchner im Laufe seiner weiteren Ausführungen zu, dass es sich wohl nur um Einzelfälle handelt.

Auch die Beobachtungen im Tierversuch weisen lediglich auf *Möglichkeiten* der Entstehung von Missbildungen beim Menschen durch Sauerstoffmangel hin, ohne aber Aussagen über die *Häufigkeit* zu gestatten. Umgekehrt ist freilich auch Grebe entgegenzuhalten, dass unsere Kenntnisse über die Entstehung der Missbildungen beim Menschen noch viel zu dürftig sind, um sagen zu können, eine bestimmte Embryopathie sei zu einem bestimmten Prozentsatz erblich, zum restlichen Prozentsatz nicht erblich. Derartige Zahlenangaben werden oft mehr gefühlsmässig gemacht, als dass sie wissenschaftlich fundiert sind.

Doch wenden wir uns wieder den Gliedmassenmissbildungen im speziellen zu. Es steht ausser Frage, dass bei Tier und Mensch über die ganze Variationsbreite dieses Formenkreises hinweg zahlreiche einwandfreie Fälle von Vererbung derartiger Embryopathien bekannt sind. Als besonders eindrucksvolle Beispiele seien kurz genannt: für das Tier die gänzlich extremitätenlosen, einfach-rezessiv mendelnden sogenannten Stromlinienschweine und die ähnlich beschaffenen «amputierten» Kälber mit dem gleichen Erbgang, für den Menschen die hand- und fusslosen brasilianischen Geschwister sowie die holländische Familie mit sogenannten Amputationsstümpfen und anderen Gliedmassendefekten bei 5 von 8 Geschwistern. Freilich muss zu diesen beiden letzten Fällen gesagt werden, dass hier nur eine «horizontale Vererbung», das heisst lediglich mehrfaches Auftreten der



*a*

*b*

Abb. 7 *a*, *b*. Spalthand beiderseits, Katze, ♀, 3 Wochen alt.

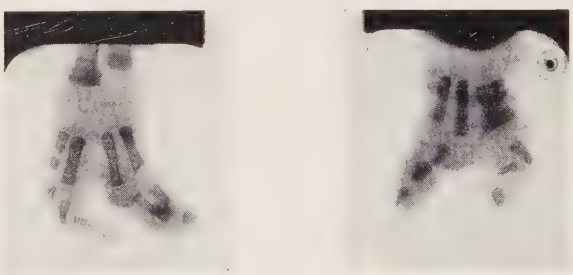


Abb. 7 *c*. Röntgenbilder der Vorderpfoten des gleichen Tieres.

Defekte in *einer* Geschwisterschaft beobachtet wurde, keine «vertikale Vererbung», das heisst Auftreten von Merkmalsträgern in mehreren Generationen. Wir kommen noch auf die Frage zurück, ob «horizontale Vererbung» wirklich immer als ausreichender Beweis für Erblichkeit betrachtet werden darf.

Abb. 8. 4 Monate altes Weisses Riesenkaninchen mit nichterblicher Acheirie.

Auch bei den Gliedmassenmissbildungen ist es wieder so, dass bestimmte Typen mindestens vorwiegend, wenn nicht ausschliesslich erbbedingt auftreten. Dazu gehören Spalthand und Spaltfuss bei Mensch und Tier. Abbildung 7, *a–c*, führt diese Missbildung aus eigenen Versuchen bei der Katze vor. Bei Tier und Mensch ist der Erbgang einfach-dominant, die Homozygoten scheinen hier wie dort letal zu sein. Auch im Erscheinungsbild ist eine weitgehende Übereinstimmung festzustellen: die vorderen/oberen Extremitäten sind häufiger und stärker befallen als die hinteren/unteren.

Für das Kaninchen wurde nicht ganz treffend unter dem Namen Brachydaktylie von Greene und Saxton[17] ein Erbleiden mit sehr variablem Erscheinungsbild beschrieben. Die befallenen Individuen zeigen alle Übergänge von nur ganz geringfügigen Defekten an einer Extremität, wie Fehlen einer oder mehrerer Krallen, bis zu solchen mit vollständiger Acheiropodie an allen Gliedmassen. Gewöhnlich sind die Metacarpalia und Metatarsalia rudimentär, andere Hand- und Fusswurzelknochen fehlen ganz, oder es sind nur ein paar unregelmässige Knochenfragmente vorhanden. Wie bei so vielen Gliedmassenmissbildungen sind auch hier die vorderen Extremitäten häufiger und stärker defekt als die hinteren. Die Missbildung wird einfach-rezessiv und geschlechtsunabhängig vererbt. In dem grossen, von den Verfassern untersuchten Material wurden sowohl in $F_2$ als auch in $RF_2$ die theoretisch erwarteten Spaltungszahlen sehr genau verwirklicht, das heisst die Penetranz ist 100prozentig, wenn auch die Expressivität sehr stark wechselt.

Die eingehenden embryologischen Untersuchungen lassen erkennen, dass die Entwicklung der Feten bis zum 18. Trächtigkeitstage normal ist. Von da ab beobachtet man an einzelnen Gliedmassenknospen eine Ausweitung der Blutgefässe, Austreten von Blut und Bildung von Blutblasen. Die Hämorrhagien führen zu einer Nekrose des befallenen Gewebes, die gangränösen Teile werden abgestossen, die Stümpfe vernarben. Bis zum 25. Tag des Fetallebens wird der Zustand der Extremitäten erreicht, den man dann bei der Geburt am 31. Tage vorfindet. Die Blutgefässe sind morphologisch normal, ebenso das Blut, Thromben fehlen. Die Verfasser vermuten, dass vasomotorische Störungen die primäre Ursache der Fehlentwicklung sind.

Als die Arbeit von Greene und Saxton 1939 erschien, hatte ich kurz zuvor von einem Züchter Weisser Riesenkaninchen drei männliche Jungtiere (ein Tier in Abb. 8), Wurfgeschwister, erhalten, die die gleichen Gliedmassenmissbildungen wie die Tiere des amerikanischen Stammes aufwiesen. Auch hier war der Befall der Vordergliedmassen stärker als der der Hintergliedmassen. Während vorn eine weitgehende Acheirie vorlag (vgl. das Röntgenbild des linken Unterarms in Abb. 9 neben dem der normalen Mutter des Tieres in Abb. 10), waren die hinteren Extremitäten bis auf das Fehlen einzelner Krallen normal.

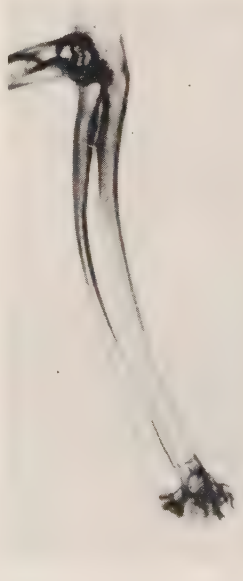


Abb. 9. Röntgenbild des Unterarms des Riesenkaninchens mit Acheirie.

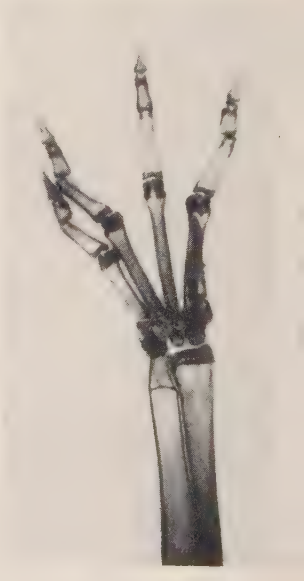


Abb. 10. Röntgenbild von Unterarm und Hand der normalen Mutter des Riesenkaninchens mit Acheirie.

Bei der völligen Übereinstimmung des Bildes mit dem der amerikanischen Kaninchen und dem Befall

[17] H. S. N. Greene and J. A. Saxton, J. exper. Med. *69*, 301 (1939).

von drei Tieren eines Wurfes erschien mir zunächst die Erblichkeit gesichert («horizontale Vererbung»!). Durch Paarung der befallenen Rammler mit ihrer Mutter sowie mit anderen normalen Häsinnen und nachfolgender Inzucht über mehrere Generationen konnte indessen an einer grossen Zahl von Tieren der Beweis geliefert werden, dass in unserem Falle die Missbildungen *nicht* erblich waren. Auch in den folgenden Jahren erhielt ich von Züchtern wiederholt Tiere mit ähnlichen Missbildungen mehr oder weniger starken Grades. Alle wurden genetisch geprüft, doch erfolgte in keinem Falle eine Vererbung der Defekte.

Die Frage, wann die Defekte der von mir untersuchten Kaninchen eingetreten sind, lässt sich nicht mit Sicherheit entscheiden. Sowohl der Züchter der Weissen Riesenkaninchen als auch die Züchter der später erhaltenen Tiere versicherten mir allerdings, dass die Defekte angeboren seien. Da aber die meisten Züchter die neugeborenen Jungen nicht unmittelbar nach der Geburt untersuchen oder doch zum mindesten eine genaue Inspektion jedes einzelnen Tieres in der Regel erst nach einigen Tagen vornehmen, ist die Möglichkeit einer postnatalen Verursachung und Entstehung des Defektes nicht von der Hand zu weisen. In einem Falle zeigte ein rein schwarzes Kaninchen an den Fußstummeln weisse Haare, eine Beobachtung, die bei Tieren mit nach der Geburt entstandenen Traumen, wie Verstümmelung des Jungen durch das Muttertier, des öfteren zu machen ist. Einen Beweis für eine postnatale Defektbildung auf recht simple Art erhielt ich vor 3 Jahren. Im Februar 1953 wurde in meinen Zuchten bei grosser Kälte ein Wurf von 5 Jungen geboren. Das Nest war nicht sehr reich an Wolle, und die Jungen wurden stark verklammt und unterkühlt darin gefunden. Durch künstliche Erwärmung gelang es, sie wieder beweglich zu machen, doch gingen 3 Junge trotzdem bald darauf ein, während 2 am Leben erhalten werden konnten. Bei beiden beobachteten wir indessen in den nächsten Tagen eine Verfärbung und ein Nekrotischwerden der Vorderzehen und -füsse und den Verlust einzelner Krallen der Hinterzehen. Das definitive Bild entsprach ganz dem der früher untersuchten Weissen Riesen und der Tiere mit der erblichen Brachyphalangie. Beide Jungen, ♀ und ♂, wurden aufgezogen und im Rahmen anderer Versuche (Pelger-Anomalie) miteinander gepaart, selbstverständlich hinsichtlich der Gliedmassendefekte mit negativem Ergebnis.

Nach diesen, wenn auch fragmentarischen Beobachtungen steht doch so viel fest, dass die beim Kaninchen gar nicht seltenen Gliedmassendefekte der beschriebenen Art sowohl als einfach mendelndes Merkmal wie auch als Phänokopie vorkommen können. Dabei dürften als phänokopierende Agenzien sehr verschiedene Faktoren in Frage kommen, und der Zeitpunkt der Einwirkung dieser Faktoren dürfte vor wie auch hinter der Geburt liegen können. Dass beim Menschen ähnliche Gliedmassenverstümmelungen als Erbmerkmal sogar noch beim Erwachsenen auftreten können, zeigen die Beobachtungen von Cooper jr., Adair und Patterson[18] bei 5 Angehörigen einer Sippe in 3 Generationen. Das Gangränöswerden der Gliedmassenenden (Füsse) erfolgte hier erst im Alter von etwa 22 Jahren, führte zu einer starken Verkrüppelung, hatte aber bei keinem der Befallenen einen letalen Ausgang.

### 4. *Phänokopien durch Zusammenwirken von Gen und phänokopierendem Agens*

Wie weitgehend Mutation und Phänokopie bei Mensch und Tier übereinzustimmen vermögen, lässt sich besonders gut am Beispiel der *Pelger-Anomalie* veranschaulichen. Es zeigt uns gleichzeitig, dass eine Phänokopie – spontan oder induziert – auch durch das Zusammenwirken eines bestimmten Gens mit einem exogenen Faktor zustande kommen kann; das phänokopierende Agens kann bei einem für das betreffende Gen heterozygoten Individuum gewissermassen an die Stelle des fehlenden zweiten Allels treten.

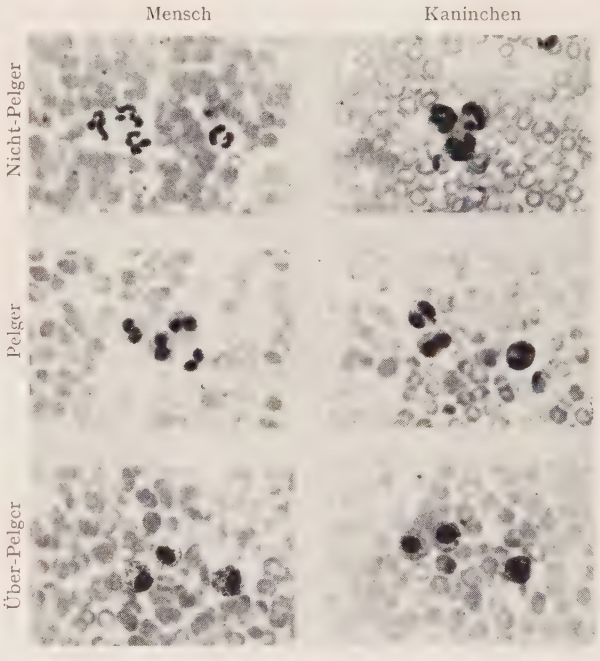



Abb. 11. Pelger-Anomalie bei Mensch und Kaninchen. In der Mitte jedes Bildes einige Neutrophile, umgeben von Erythrozyten. Oben normal segmentierte Neutrophile (Nicht-Pelger), in der mittleren Reihe Neutrophile der heterozygoten Pelger, unten Neutrophile der homozygoten Pelger (Über-Pelger).

Die Pelger-Anomalie ist eine bei Mensch und Kaninchen semidominant-erbliche Besonderheit der Kerne der neutrophilen und anderer Leukozyten. Während im normalen Blutbild von Mensch und Säugetier die

[18] G. Cooper, N. Adair and W. M. Patterson, Radiology *48*, 509 (1947).

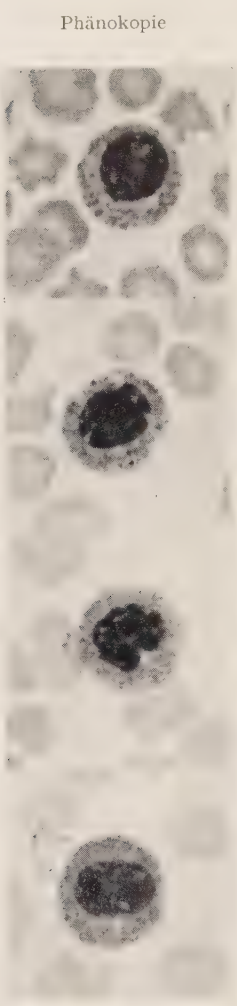
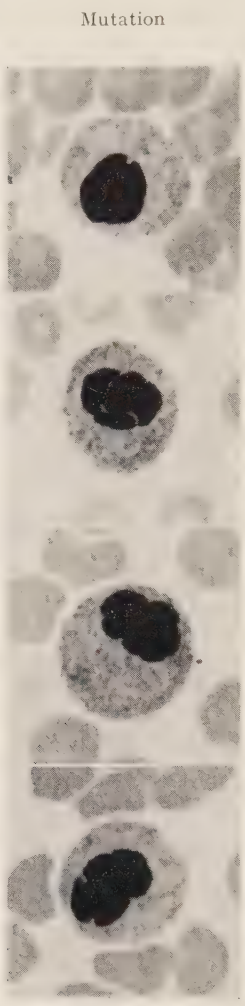



Abb. 12. Variationsbreite der reifen rundkernigen Neutrophilen beim Kaninchen. *a* Mutation: homozygotes Pelger-Kaninchen (Über-Pelger). *b* Induzierte Phänokopie des homozygoten Pelgers durch Colchicinbehandlung bei einem heterozygoten Pelger-Kaninchen.



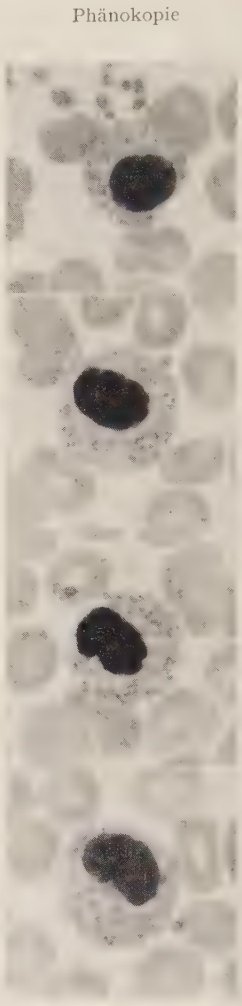




Abb. 13. Variationsbreite der reifen rundkernigen Neutrophilen beim Menschen. *a* Mutation: homozygotes Pelger-Kind mit 94% rundkernigen Neutrophilen. *b* Spontane Phänokopie des homozygoten Pelgers durch Infektion (hochfieberhafte Angina) bei heterozygotem Pelger-Kind mit 72% rundkernigen Neutrophilen.

Kerne der reifen Neutrophilen des kreisenden Blutes durch ihre Segmentierung in 3, 4, 5 und mehr Glieder gekennzeichnet sind, ist der Segmentierungsprozess bei den Pelger-Mutanten stark gehemmt, und zwar bei den heterozygoten Pelgern so, dass die Gliederung des Kernes nur selten über das Zweierstadium hinausgeht; die sogenannten Zwicker sind die Leitformen des Blutbildes der Heterozygoten. Bei den homozygoten Pelgern, auch Über-Pelger genannt, wird die Segmentierung nahezu vollständig unterdrückt, die Kerne bleiben einheitlich rund, nur selten sieht man Ansätze zu einer einfachen Segmentierung. Abbildung 11 demonstriert die Unterschiede zwischen Nicht-Pelgern, hetero- und homozygoten Pelgern bei Mensch und Kaninchen sehr deutlich.

Nach unseren Untersuchungen sind die Pelger beim Menschen gar nicht so sehr selten; in der Berliner Bevölkerung kommt auf wenig mehr als 1000 Individuen ein (heterozygoter) Pelger. Wenn man trotz dieser relativen Häufigkeit die Pelger-Anomalie erst spät entdeckte – 1928 wies der holländische Tuberkulosearzt PELGER die nach ihm benannte Anomalie erstmalig nach –, so ist dies darauf zurückzuführen, dass man bis dahin die Pelger-Fälle nicht von sogenannten Linksverschiebungen zu unterscheiden vermochte. Man rechnete sie den Fällen zu, in denen als Reaktion auf eine Infektion oder Entzündung ein stärkerer Verbrauch der älteren, hochsegmentierten Neutrophilen und dementsprechend eine prozentuale Zunahme der aus den Blutbildungsstätten nachgelieferten jugendlichen, noch nicht oder schwach segmentierten (in der tabellarischen Übersicht über das Blutbild links aufgeführten) Neutrophilen erfolgte. Mit anderen Worten: die Mutation wurde nicht erkannt, weil man sie mit ihrer «Phänokopie», eben mit der modifikatorisch bedingten Linksverschiebung, verwechselte. Während aber die Linksverschiebung als Modifikation mit der Beseitigung der Infektion oder Entzündung abklingt

ist die Pelger-Anomalie ein konstitutionell bedingtes Erbmerkmal, das heisst ein Dauerzustand.

Wie aber reagiert der (heterozygote) Pelger auf eine Infektion oder Entzündung? Um eine Antwort auf diese Frage zu erhalten, prüften wir[19] die Wirkung von Intoxikationen auf das weisse Blutbild heterozygoter Pelger-Kaninchen. Ausgewachsenen Kaninchen wurde eine 0,5prozentige Colchicin-Lösung in physiologischer NaCl-Lösung intravenös injiziert. Die Einzeldosis wurde variiert; insgesamt erhielt ein Tier bei mehrmaliger Injektion bis zu 5,43 mg. 2 mg/kg Körpergewicht wurden ohne Schaden vertragen. Es ergab sich, dass diese Intoxikation eine echte Linksverschiebung bewirkt, die eine Phänokopie des homozygoten Pelger-Blutbildes bei dem heterozygoten Pelger zur Folge hat (Abb. 12). Natürlich ist diese induzierte Phänokopie transitorisch; sie besteht nur so lange, wie das Colchicin im Körper kreist. Durch stündliche Blutuntersuchungen nach der Colchicin-Injektion lässt sich sehr schön verfolgen, wie die Zahl der reifen rundkernigen Neutrophilen im kreisenden Blute zunimmt, bis auf dem Höhepunkte der Wirkung – etwa 10–12 h nach dem Eingriff – nahezu alle Neutrophilen rundkernig sind, höchstens noch ein wenig gebuchtet; das Blutbild des Über-Pelgers wird vollständig erreicht. Später klingt die Colchicin-Wirkung langsam ab, es sei denn, dass eine neue Colchicin-Injektion erfolgt. Am 3. Tage nach der letzten Injektion ist der ursprüngliche Zustand bis auf einige restliche reife Rundkernige wiederhergestellt.

In jüngster Zeit haben wir[20] die transitorische Phänokopie des homozygoten Pelgers im heterozygoten auch spontan beim Menschen beobachten können. Ein an hochfieberhafter Angina erkranktes 10jähriges Mädchen zeigte ein weisses Blutbild, das eine überraschende Ähnlichkeit mit dem des einzigen bisher bekannten homozygoten menschlichen Pelgers[21], eines holländischen Mädchens, hatte (Abb. 13). Durch die Familienuntersuchung konnte die Pelger-Anomalie in der Sippe bei insgesamt 7 Mitgliedern in 3 Generationen nachgewiesen werden, darunter die Mutter und die Grossmutter der Probandin, während ihr Vater ein normales Blutbild besitzt. Nach der Genesung ging das Blutbild des erkrankten Mädchens wieder zum Typ des heterozygoten Pelgers zurück.

Die Beobachtungen machen deutlich, wie vorsichtig man bei der Entscheidung der Frage «Mutation oder Phänokopie» sein sollte. Bis zur Entdeckung der Pelger-Anomalie hat man die Mutante mangels Unterscheidungsmöglichkeiten kurzerhand als Linksverschiebung, also transitorische Modifikation, betrachtet. Man hat sogar, wie Undritz einmal sagte, schon Menschen ihres Blutbildes wegen am Blinddarm operiert oder wegen Tuberkuloseverdacht ins Sanatorium geschickt, und es lag gar keine Entzündung oder Infektion vor; die Betreffenden waren harmlose Pelger. Auch heute noch wird die Pelger-Anomalie von mit ihren Merkmalen nicht vertrauten Untersuchern sicher vielfach übersehen. Andererseits sind aber in letzter Zeit auch Fälle bekannt geworden, die man als Pelger-Anomalie beschrieben hat, während es sich in Wirklichkeit um eine Linksverschiebung, also eine «Phänokopie» der Pelger-Anomalie, handelte. Derartige Verwechslungen können unter Umständen schwerer wiegende Folgen haben als der umgekehrte Irrtum. Der erfahrene Kenner wird zwar in den meisten Fällen doch die echte Pelger-Anomalie von einer Linksverschiebung zu unterscheiden vermögen. Im allgemeinen aber sollte man zur Sicherung der Diagnose die Familienuntersuchung fordern. Bei der 100prozentigen Penetranz des Pelger-Gens ist, wenn die Eltern, Kinder oder sonstige nähere Verwandte zur Untersuchung zur Verfügung stehen, die Erblichkeit in der Regel unschwer zu erbringen.

### 5. *Ist «horizontale Vererbung» immer ein Beweis für Erblichkeit?*

Schon mehrfach haben wir die Frage berührt, ob «horizontale Vererbung», das heisst Auftreten des gleichen Symptoms oder Syndroms lediglich in einer Geschwisterschaft, schon als ausreichender Beweis für Erblichkeit betrachtet werden darf. Beim Menschen ist im Falle rezessiven Erbgangs seltener pathologischer Merkmale der Nachweis vertikaler Vererbung, das heisst über mehrere Generationen, ohne Inzucht und bei der Kleinheit der menschlichen Familie sehr erschwert und oftmals unmöglich. Innerhalb einer Geschwisterschaft, seien es beim multiparen Tier die Jungen eines Wurfes oder beim Menschen Zwillinge und Mehrlinge oder aber auch die Kinder aufeinanderfolgender Schwangerschaften, ist indessen mit der Möglichkeit zu rechnen, dass der gleiche exogene Faktor – wie bei unseren Kaninchen mit den Gliedmassendefekten – wirksam ist und so eine Erblichkeit nur vorgetäuscht wird. Beim Kaninchen konnten wir durch Behandlung trächtiger Häsinnen mit Trypanblau bestimmte Embryopathien, wie Brachyurie und Anurie, phänokopisch produzieren[22]. Es zeigte sich, dass die gleichen Missbildungen auch in den folgenden Würfen noch auftreten können, selbst wenn keine neue Trypanblau-Injektion während der weiteren Schwangerschaften erfolgt.

An die Möglichkeit der fortgesetzten Wirkung des gleichen exogenen Faktors sollte vor allem dann gedacht werden, wenn in grösseren Geschwisterschaften die Merkmalsträger sich stark häufen. Bei rezessiver Vererbung liefert die Paarung zweier Heterozygoten theoretisch 25% Merkmalsträger. In der erwähnten

[19] H. Nachtsheim, Arch. Klaus-Stift. Vererb.-Forsch. *25*, 566 (1950). – Helga Harm, Acta haemat. *10*, 95 (1953).

[20] Thea Lüers, H. Nachtsheim und G. Petzel, Blut *2*, 177 (1956).

[21] N. Haverkamp Begemann and A. van Lookeren Campagne, Acta haemat. *7*, 295 (1952).

[22] Helga Harm, Z. Naturforsch. *9b*, 536 (1954).

holländischen Familie wiesen 5 von 8 Geschwistern die Gliedmassendefekte auf; theoretisch waren unter 8 Geschwistern 2 Merkmalsträger zu erwarten. Natürlich sind die 5 defekten Individuen kein Beweis *gegen* Erblichkeit (zufällige Abweichung vom 3:1-Verhältnis, Interessantheitsauslese?). In anderen Fällen häufen sich indessen unsere Bedenken.

So ist bekannt, dass zum Beispiel bei einer Mutter, die einmal ein Kind mit Anencephalie zur Welt gebracht hat, gar nicht selten 1, 2, 3 und mehr Kinder mit der gleichen schweren Embryopathie folgen. Wenn es auch offenbar erbliche Formen von Anencephalie gibt, so sprechen doch diese Beobachtungen sehr für Nicht-Erblichkeit, also für Phänokopien. In der Tat glaubt KATSUNUMA[23], den teratogen wirkenden Faktor gefunden zu haben: einen Mangel im Mineralstoffwechsel. Durch Verabreichung von kolloidalem Eisen und Calciumhypophosphat an schwangere Frauen, die bereits ein oder mehrere Kinder mit Anencephalie hatten, sollen in der Folge nur gesunde Kinder (2–4) geboren worden sein. Freilich bleibt immer noch die Annahme möglich, dass der Defekt im Mineralstoffwechsel der Mutter eine erbliche Grundlage hat, dass also gewissermassen durch die Therapie der Normalzustand «phänokopiert» wird.

### 6. *Eine Methode zur Bestimmung des Anteils von Mutation und Phänokopie bei einem menschlichen «Erb»leiden*

Dass sich trotz des Fehlens der Möglichkeit einer experimentellen Genanalyse auch beim Menschen Wege finden lassen, um den Anteil von Mutation einerseits, Phänokopie andererseits, an der Entstehung eines pathologischen Erscheinungsbildes zu bestimmen, soll noch ein letztes Beispiel veranschaulichen.

Eines der furchtbarsten, wenn auch glücklicherweise seltenen Erbleiden ist das dominant-erbliche Retinoblastom, eine äusserst bösartige Netzhautgeschwulst, die in der Regel Kinder in den ersten 4 Lebensjahren befällt und fast stets zu einem qualvollen Tode führt, wenn nicht rechtzeitig durch Strahlentherapie eingegriffen oder das befallene Auge, notfalls auch noch das zweite Auge, entfernt wird. Die Zahl der Fälle, in denen eine Vererbung des Retinoblastoms von einer Generation auf die folgende nachgewiesen wurde, ist indessen verhältnismässig gering im Vergleich zu der sehr grossen Zahl sporadischer Fälle. Da die Ausmerzung der Merkmalsträger sehr stark ist, war man geneigt, die sporadischen Fälle als Neumutationen zu betrachten und errechnete mit ihrer Hilfe eine sehr hohe Mutationsrate für das zugrundeliegende Gen. An Hand eigener Untersuchungen kam indessen VOGEL[24] zu dem Ergebnis, dass höchstens 25% der sporadischen Fälle Neumutationen sind, die übrigen 75% aber durch exogene Faktoren oder somatische Mutation – was ebenfalls Nicht-Erblichkeit bedeutet – hervorgerufene Phänokopien. VOGEL ging bei seinen Überlegungen von der Tatsache aus, dass noch im vorigen Jahrhundert praktisch alle vom Retinoblastom befallenen Kinder starben. Dank der therapeutischen Erfolge durch Operation und Bestrahlung ist es, wie sich an Hand der Unterlagen feststellen lässt, in den letzten Jahrzehnten gelungen, mindestens 20% aller Retinoblastom-Träger der Generation der Eltern der jetzigen Patienten am Leben zu erhalten und ins fortpflanzungsfähige Alter zu bringen. Wenn alle Retinoblastome auf Erblichkeit beruhen, sollte dadurch die Zahl der als erblich nachweisbaren Fälle zunehmen. Diese Zunahme ist indessen nicht festzustellen. Ausserdem sollten bei Erblichkeit aller sporadischen Fälle und einfach-dominanter Vererbung mit relativ hoher Penetranz, wie sie für die Sippen mit sicher erblichem Retinoblastom erwiesen ist, nahezu die Hälfte der Kinder aller zur Fortpflanzung kommenden sporadischen Merkmalsträger wiederum von dem Leiden befallen werden. Tatsächlich erkrankten aber von 42 erfassten Kindern entsprechender Abstammung nur 3 = 7%. Die bisher zur Verfügung stehenden Zahlen sind leider klein, und es würde sich wohl lohnen, die von VOGEL für den Raum Berlin-Brandenburg durchgeführten Untersuchungen in grösserem Rahmen, am besten auf internationaler Basis vorzunehmen, um in dieser auch eugenisch so wichtigen Frage zu gesicherten Ergebnissen bezüglich des Prozentsatzes der erblichen Fälle von Retinoblastom zu kommen.

*Summary*

The concept of phenocopy established by GOLDSCHMIDT in 1935 is critically studied and special emphasis is placed upon the problem of how to distinguish true and false phenocopies. A comparison is made with true and false "genocopies", that means mimic mutations. Regarding a given character it is often hard to distinguish as far as man and mammals are concerned, whether it is caused by mutation or phenocopy. Although most of the abnormalities occur as hereditary as well as non-hereditary types, there are, however, hereditary defects that occur seldom and others that occur frequently as phenocopies; still other abnormalities are known as yet only as non-hereditary modifications. It is still impossible to give exact figures for the numerical relationship of single hereditary and non-hereditary abnormalities in man.

In certain cases in man and animals there may be also an interaction of the gene and the phenocopying agent, the latter replacing the missing second allele of the gene in question in a heterozygotic individual. The question has to be examined whether in the case of "horizontal inheritance", that means occurrence of the same character only in one sibship, a hereditary effect is only simulated with the same phenocopying factor continually in effect. Finally a method is given to determine the relationship of mutations and phenocopies of the retinoblastoma, a hereditary or exogeneous caused highly malignant ocular neoplasm in man, a question very important to eugenics.

[23] S. KATSUNUMA, Proc. imp. Acad. Japan *24*, 1 (1949).
[24] F. VOGEL, Z. menschl. Vererb. Konst.-Lehre *32*, 308 (1954).

# Brèves communications - Kurze Mitteilungen
# Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

## Über die Beeinflussung des Dunkelstromes bei RCA-Photomultipliern

Für die Anwendung von Photomultipliern in der Ramanspektroskopie ist es wesentlich, dass der Dunkelstrom von Multipliern wegen der geringen Lichtleistung der Raman-Linien sehr klein ist. Angeregt durch die Arbeiten von NÁRAY[1] und VALENCÉ[2] wurde versucht, den Dunkelstrom selbst zu beeinflussen. Als Schirm wurde Aquadag direkt auf die Glasumhüllung des Photomultipliers gebracht, sowie in einer zweiten Versuchsreihe die Röhre mit einer Aluminiumfolie umgeben. Beide Schirmarten waren in ihrer Wirkung gleichwertig. Die Wirkung des Hüllenpotentials auf den Dunkelstrom war bei den meisten untersuchten Photomultipliern im Sinne einer Verschlechterung. In der

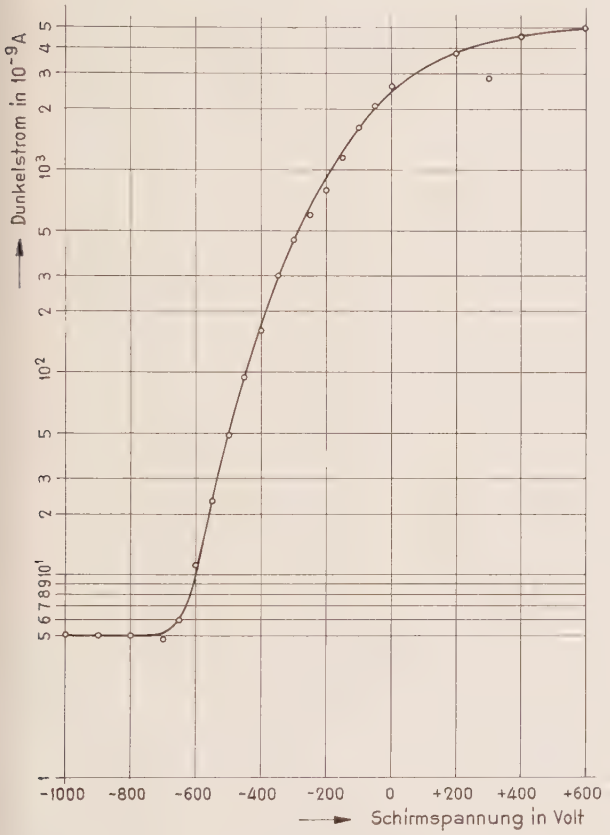



Abb. 1. Dunkelstrom eines IP21 Photomultipliers in Funktion der äusseren Schirmspannung. $J_D$ (ohne Schirm) $= 2 \pm 1 \cdot 10^{-9}$ A.

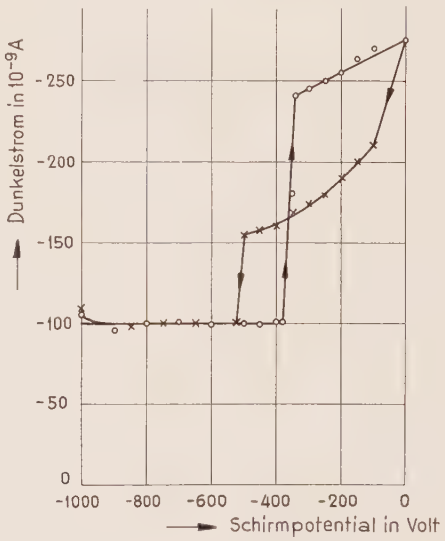



Abb. 2. Hystereseeffekt des Dunkelstromes in Funktion des angelegten äusseren Schirmpotentiales. IP21. Nr. 7. Zeitintervall zwischen den einzelnen Messpunkten 10 Minuten.

Tabelle sind einige typische Messresultate dargestellt.

Dabei bedeuten $J_{d1}$ gemessener Dunkelstrom mit freiem Glaskolben, die totale Dynodenspannung betrug bei allen Messungen 1080 V, $J_{d2}$ Dunkelstrom mit Umhüllung bei Potential 0 V und $J_{d3}$ kleinster gemessener Dunkelstrom bei einem angelegten Potential der Hülle von $V_H$ V.

Entgegen der Ansicht von VALENCÉ[2] ergibt bei guten Multipliern die Anlage eines künstlichen Hüllenpotentials keinen besonderen Vorteil, es sei denn zur Abschirmung von starken Störfeldern. Es scheint jedoch, dass bei schlechten Multipliern durch das Anlegen eines

| Nr. | $J_{d1}$ $10^{-9}$ A | $J_{d2}$ $10^{-9}$ A | $V_H$ | $J_{d3}$ $10^{-9}$ A |
|---|---|---|---|---|
| 1P28 1 | $76 \pm 5$ | $250 \pm 20$ | $-900$ bis $-550$ | $90 \pm 5$ |
| 1P28 2 | $17 \pm 3$ | $20 \pm 5$ | $-1000$ bis $-400$ | $16 \pm 5$ |
| 1P28 3 | $3 \pm 2$ | $5 \pm 4$ | $-800$ bis $-200$ | $3 \pm 2$ |
| 1P28 4 | $40 \pm 10$ | $20 \pm 5$ | $-800$ bis $-600$ | $17 \pm 3$ |
| 1P28 5 | $1200 \pm 200$ | $100 \pm 10$ | $-1000$ bis $0$ | $100 \pm 10$ |
| 1P21 6 | $4 \pm 2$ | $600 \pm 50$ | $-1000$ bis $-600$ | $10 \pm 2$ |
| 1P21 7 | $10 \pm 2$ | $250 \pm 20$ | $-1000$ bis $-500$ | $30 \pm 5$ |
| 1P21 8 | $2 \pm 1$ | $2000 \pm 100$ | $-1000$ bis $-600$ | $10 \pm 2$ |
| 1P21 9 | $7 \pm 2$ | $5100 \pm 100$ | $-1000$ bis $-600$ | $12 \pm 2$ |

[1] Z. S. NÁRAY, Acta phys. hung. *5*, 159 (1955).
[2] L. P. VALENCÉ, Brit. J. appl. Phys. *6*, 311 (1955).

Potentials eine wesentliche Verkleinerung des Dunkelstromes erreicht werden kann (Nr. 5).

Der typische Verlauf des Dunkelstromes in Abhängigkeit des angelegten Potentials ist in Abbildung 1 wiedergegeben.

Es ist interessant noch zu bemerken, dass bei einigen (nicht bei allen) untersuchten Photomultipliern ein Hysterese-Effekt, wie er in Abbildung 2 dargestellt ist, beobachtet wurde.

Der Wert des Dunkelstromes für eine bestimmte Spannung war in einem bestimmten Bereich verschieden, je nachdem in einer steigenden oder fallenden Spannungsreihenfolge gemessen wurde, trotzdem die Zeitintervalle zweier aufeinanderfolgender Messpunkte 10 min waren. Dieser Effekt hängt wahrscheinlich mit einer von gestreuten Elektronen erzeugten Lumineszenz des Glaskolbens zusammen.

J. Linder und E. Lüscher

*Optisches Labor Metrohm S.A., Herisau-Lausanne, den 15. Oktober 1956.*

*Summary*

The influence of an exterior electrical field on the dark current of RCA-photomultipliers has been studied and a hysterese effect has been observed. The exterior field causes a diminution of the dark current only on tubes with very high "normal" dark current.

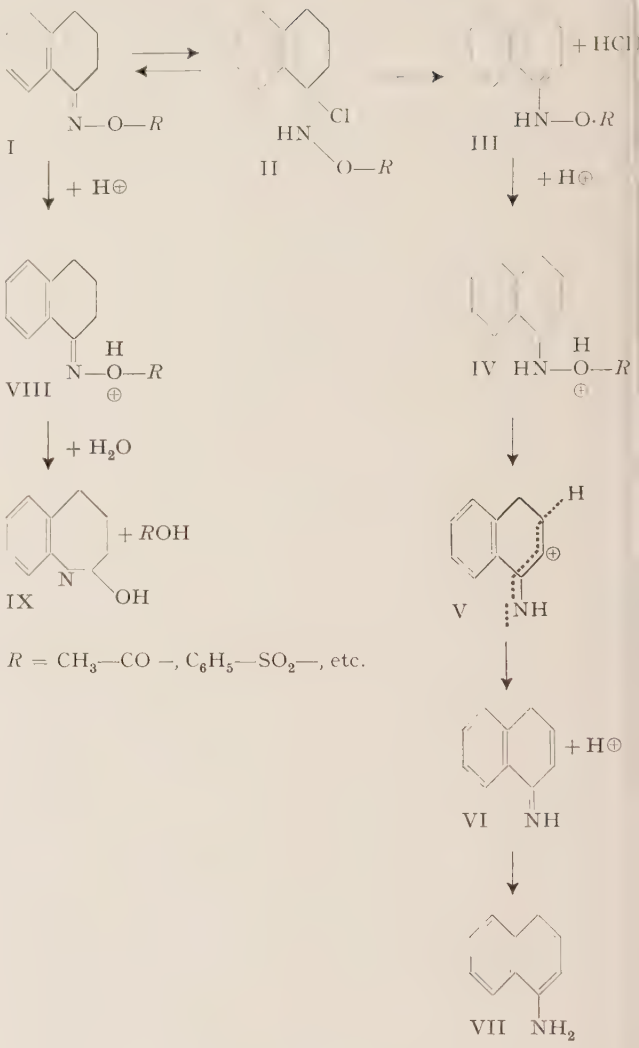
## Abnormal Beckmann Rearrangements A Mechanism of the Semmler Reaction

The "Wolff" aromatization reaction[1] owes its origin to Semmler[2]. In view of a recent publication[3] on this subject our views on the mechanism are presented, as work on this reaction is in progress.

In our opinion, the reaction takes place as a result of the abnormal decomposition of the oxime ester salt (II) itself[4]. It is postulated that this salt decomposes in two distinct ways, viz:

(1) the normal Beckmann rearrangement, which is generally a fast change, the overall velocity of which depends upon the electron attracting capacity of the group $R$[5].

(2) the Semmler rearrangement, which is kinetically slower but thermodynamically favoured because of the endocyclic double bond in III as against the exocyclic bond in I[6] and the release of resonance energy by the formation of VII. It is suggested that protonation of the hydroxylamine derivative III, results in the formation of a mesomeric cation V which stabilizes itself by the release of a proton resulting in VII, through VI.




$R$ = $CH_3$—CO –, $C_6H_5$—$SO_2$—, etc.

According to the present mechanism use of drastic conditions[7] or having a strongly electron attracting group like $C_6H_5$–$SO_2$–[8] should favour the former course, at the expense of the latter. This is in conformity with experiment. A similar mechanism in envisaged for the aromatization of monocyclic $\alpha,\beta$-unsaturated ketone oximes[9].

M. V. Bhatt

*Department of Organic Chemistry, Indian Institute of Science, Bangalore, India, October 4, 1956.*

*Résumé*

Un mécanisme pour la réaction de Semmler («Wolff Aromatisation») a été proposé.

[1] L. Wolff, M. Gabler, and F. Heyl, Ann. *322*, 362, 380 (1902).
[2] W. Semmler, Ber. dtsch. chem. Ges. *25*, 3352 (1892).
[3] A. Hardy, E. R. Ward, and L. A. Day, J. chem. Soc. *1956*, 1979.
[4] When the acyl radical is strongly electron attracting e.g. $R$ = $C_6H_5$–$SO_2$– no salt of the type II may be formed as the oxime ester undergoes normal Beckmann change.
[5] B. Jones, Chem. Rev. *35*, 335, 337 (1944).
[6] H. C. Brown, J. H. Brewster, and H. Shechter, J. Amer. chem. Soc. *76*, 467 (1954).
[7] E. C. Horning, V. L. Stromberg, and H. A. Lloyd, J. Amer. chem. Soc. *74*, 5153 (1952).
[8] G. Schroeter, Ber. dtsch. chem. Ges. *63*, 308 (1903).
[9] L. Wolff, M. Gabler, and F. Heyl, Ann. *322*, 362, 380 (1902). – E. C. Horning, V. L. Stromberg, and H. A. Lloyd, J. Amer. chem. Soc. *74*, 5153 (1952).

## On the Sulphur Analogue of Azoxy-Benzene: Azo-Thio-Benzene

In continuation of previous work on organic sulphur compounds[1], we treated thionyl-aniline, $C_6H_5$-NSO, first prepared by MICHAELIS and HERZ[2] from thionyl-chloride and aniline, with sodium in boiling toluene and obtained a reddish oil which can be purified by careful distillation *in vacuo*. Elementar analysis and molecular weight determination (cryoscopy in benzene) gave results in accordance with the formula $C_{12}H_{10}N_2S$ (calculated: C 67·29%; H 4·67%; N 13·09%; S 14·96%; found: C 67·14%; H 4·75%; N 13·14%; S 15·04%; molecular weight, calculated: 214·27; found: 202·64). By heating with powdered zinc the substance is desulphurated to azo-benzene. These facts together with deep colour of the product, are in favour of a structure corresponding to azo-thio-benzene

$$C_6H_5—N_2(S)—C_6H_5,$$

the sulphur analogue of azoxy-benzene.

From *p*-chloro- and *p*-bromo-aniline, following the same procedure, dichloro- and dibromo-azo-thio-benzene have been obtained.

The UV-absorption spectra, in *n*-hexane solution (concentration $10^{-2}$ g/l) of azo-thio-benzene and of its bromo-derivative shows a maximum at 410 resp. 425 m$\mu$ (lg $\varepsilon$ 3,99 resp. 4,18).

Details of preparation and experiments in progress will be published elsewhere.

G. LEANDRI and P. REBORA

*Institute of Industrial Chemistry, University of Bologna (Italy), September 24th, 1956.*

*Riassunto*

Trattando la tionil-anilina con sodio, in toluolo bollente, si ottiene l'azo-tio-benzolo, l'analogo solforato dell'azossi-benzolo.

Con lo stesso procedimento, dalla *p*-bromo- e dalla *p*-clorotionil-anilina, è stato preparato il *p*-*p*'-dibromo- ed il *p*-*p*'-dicloro-azo-tio-benzolo.

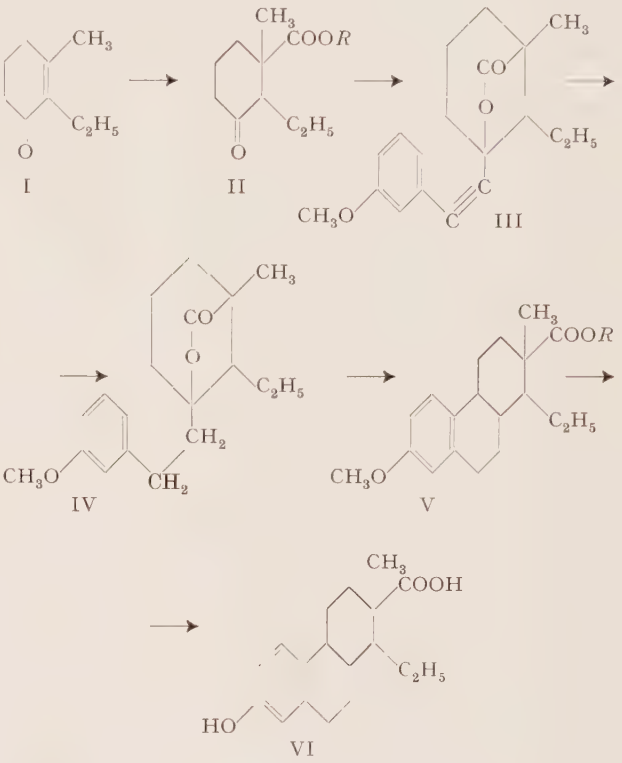
Sono stati registrati gli spettri UV dell'azo-tio-benzolo e del *p*-*p*'-dibromo-derivato.

[1] G. LEANDRI *et al.*, see e.g. notes I–XVI, Ann. Chim. *44* (1954) and *45* (1955).

[2] A. MICHAELIS and R. HERZ, Ber. dtsch. chem. Ges. *23*, 3480 (1890).

## Neue Totalsynthese einer razemischen Doisynolsäure[1]

Durch die hervorragenden Arbeiten von MIESCHER *et al.*[2] wurde die Doisynolsäure, die erstmals von DOISY *et al.*[3] aus Östron dargestellt worden war, als 1-Äthyl-2-methyl-7-hydroxy-1,2,3,4,9,10,11,12-octahydrophenanthren-2-carbonsäure (VI) identifiziert. Von den acht möglichen stereoisomeren Razematen stellten ANNER und MIESCHER[4] auf totalsynthetischem Wege deren fünf in Form der Methyläther dar, indem sie als Ausgangsstoffe die drei kristallisierten Ketoester verwendeten, die aus dem Bachmannschen öligen Ketoester[5] erhalten werden konnten; zwei dieser Razemate erhielten sie auch durch Reduktion des α-Monodehydro-doisynolsäure-methylesters mittels Natrium und Ammoniak und nachfolgende Verseifung. HUNTER und HOGG[6] reduzierten die synthetische Monodehydro-doisynolsäure mit katalytisch angeregtem Wasserstoff und gewannen hierbei ebenfalls zwei razemische 7-Methyldoisynolsäuren (V, $R$ = H), deren eine mit keinem der fünf Razemate von ANNER und MIESCHER[4] identisch zu sein scheint.




Im Hinblick auf die hohe östrogene Wirksamkeit einiger Stereoisomeren der 7-Methyldoisynolsäure waren wir bemüht, eine geeignete Synthese dieser Verbindungen zu finden, die die Darstellung einer zur eingehenderen pharmakologischen, eventuell auch klinischen Prüfung nötigen Substanzmenge gestatten würde. Wir gelangten hierbei durch ein neues, im Schema angedeutetes Verfahren zu einem kristallinen Razemat der erwähnten Säure (V, $R$ = H) und von diesem zu einer neuen Doisynolsäure (VI).

Ausgehend von 2-Äthyl-3-methyl-2-cyclohexen-1-on (I), das durch Äthylierung und Hydrolyse von Hagemanns Ester zugänglich ist[7], erhielten wir durch Anlagerung von Cyanwasserstoff und nachfolgende Hydrolyse die kristalline 2-Äthyl-3-methylcyclohexanon-3-carbonsäure (II, $R$ = H) vom Schmelzpunkt 137–138°. Der durch Umsetzung mit Diazomethan oder mit

[1] XIII. Mitteilung *Synthetische Versuche in der Gruppe der östrogenen Hormone;* XII. Mitteilung siehe Chem. listy *50*, 2004 (1956).

[2] K. MIESCHER, Helv. chim. Acta *27*, 1727 (1944); Chem. Rev. *43*, 367 (1948).

[3] D. W. MAC CORQUODALE, S. A. THAYER und E. A. DOISY, J. biol. Chem. *99*, 327 (1933); *101*, 753 (1933); U.S. Patent 2,069.096 (1933).

[4] G. ANNER und K. MIESCHER, Helv. chim. Acta *30*, 1422 (1947).

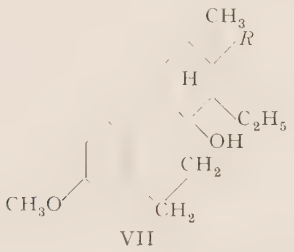
[5] W. E. BACHMANN, S. KUSHNER und A. C. STEVENSON, J. Amer. chem. Soc. *64*, 974 (1942).

[6] J. H. HUNTER und J. A. HOGG, J. Amer. chem. Soc. *68*, 1676 (1946); *71*, 1922 (1949).

[7] L. I. SMITH und G. F. ROUAULT, J. Amer. chem. Soc. *65*, 631 (1943).

methylalkoholischer Chlorwasserstofflösung erhaltene Methylester (II, $R = CH_3$; Siedepunkt$_1$ 92–93°; Semicarbazon, Schmelzpunkt 210–212°; 2,4-Dinitrophenylhydrazon, Smp. 138°) wurde mit Kalium-*m*-methoxyphenylazetylid[8] in tertiärem Butylalkohol umgesetzt. Hierbei entstand in guter Ausbeute das Azetylenderivat vom Sdp.$_{0,2}$ 195–200°, der Bruttoformel $C_{19}H_{22}O_3$ (offensichtlich III), das bei der Hydrierung an Palladium quantitativ 2 Mol Wasserstoff aufnahm und in eine Verbindung der Bruttoformel $C_{19}H_{26}O_3$ überging; beim Kristallisieren aus Petroläther wurden 40% eines kristallinen Anteiles vom Schmelzpunkt 70° gewonnen. Die Verbindung entspricht auf Grund ihrer Summenformel, des Ergebnisses der Methoxylbestimmung, der Laktontitrierung und schliesslich auch ihres infraroten Spektrums[9] dem Lakton der 1-(2-*m*-Methoxyphenyläthyl)-2-äthyl-3-methylcyclohexanol-3-carbonsäure (IV).

Zur weiteren Charakterisierung dieser Verbindung zogen wir die alkalische Hydrolyse heran, bei der wir eine kristalline Hydroxysäure (VII, $R$ = COOH) vom Schmelzpunkt 106° erhielten, die sehr unbeständig war und beim Erwärmen leicht in das Ausgangslacton überging. Zum gleichen Zweck diente auch die Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid, wobei ein um 4 Wasserstoffatome reicherer kristalliner Stoff vom Schmelzpunkt 87° entstand, offenbar das Diol VII ($R = CH_2OH$).




VII

Das Lakton IV wurde mittels Chlorwasserstoff und Aluminiumchlorid in siedendem Benzol zyklisiert. Als Reaktionsprodukt isolierten wir in guter Ausbeute eine amorphe, teilweise demethylierte Carbonsäure. Sie wurde deshalb mit Dimethylsulfat in alkalischer Lösung methyliert und hierauf mit Diazomethan esterifiziert. Der entstandene Methylester wurde chromatographisch gereinigt und destilliert (Sdp.$_{0,08}$ 190°); seine Bruttoformel war $C_{20}H_{28}O_3$ und entsprach dem erwarteten 7-Methyl-doisynolsäure-methylester (V, $R = CH_3$). Die durch alkalische Verseifung erhaltene amorphe Säure (Smp. 50–60°) wies im Test nach Bülbring und Burn an infantilen kastrierten Rattenweibchen eine dem Östradiolbenzoat ungefähr gleiche östrogene Wirksamkeit auf[10].

Diese amorphe Säure ist in warmer Natriumcarbonatlösung löslich und scheidet sich beim Abkühlen der Lösung zum Teil in Form eines kristallinen Natriumsalzes aus. Beim Ansäuren der Lösung dieses Salzes erhielten wir die kristalline Monocarbonsäure $C_{19}H_{26}O_3$ (V, $R$ = H), die sich aus Methanol kristallisieren lässt und bei 189–191° schmilzt. Dieser Schmelzpunkt stimmt mit den Angaben von Anner und Miescher[4] für die hochwirksamen Stereoisomeren der 7-Methyl-doisynolsäure A $\alpha$ (Smp. 187–188°) und C $\beta$ (Smp. 189–191°) überein und nähert sich ihrer Angabe für das Stereoisomere C $\alpha$ (Smp. 179–181°). Ein direkter Vergleich unserer Substanz mit den erwähnten Stereoisomeren A $\alpha$, C $\alpha$ und C $\beta$, der durch die ausserordentliche Liebenswürdigkeit des Herrn Dr. G. Anner in den Laboratorien der Ciba Aktiengesellschaft in Basel erfolgte, deutet darauf hin, dass unser Produkt höchstwahrscheinlich mit dem Stereoisomeren C $\alpha$ der Konfiguration *cis-anti-cis* identisch ist. Die infraroten Spektren beider Substanzen sind identisch und der Mischschmelzpunkt beider Proben, deren Schmelzpunkte etwas unterschiedlich sind, zeigte nur eine ganz geringe Depression. Hingegen weisen die Mischschmelzpunkte mit den Stereoisomeren A $\alpha$ und C $\beta$ beträchtliche Depressionen auf, und auch in den infraroten Spektren sind sichtliche Unterschiede. Die wiederum mittels des gleichen Testes[10] bestimmte östrogene Wirksamkeit unserer kristallinen Säure ist dieselbe wie die der amorphen Probe, das heisst, sie kommt der Wirksamkeit des Östradiolbenzoats gleich.

Durch Demethylierung unserer Substanz mit Pyridinhydrochlorid erhielten wir eine neue Doisynolsäure (VI) vom Schmelzpunkt 113–117° (Methanol), deren Analyse der Zusammensetzung $C_{18}H_{24}O_3 \cdot 0{,}5\ H_2O$ entspricht.

M. Protiva, J. O. Jílek,
E. Adlerová und L. Novák

*Forschungsinstitut für Pharmazie und Biochemie in Prag, den 1. Oktober 1956.*

*Summary*

A new synthesis is described of a crystalline 7-methyldoisynolic acid showing a strong estrogenic activity. This acid is probably identical with the stereoisomer C $\alpha$ of Anner and Miescher. Demethylation of this methoxyacid yields a new doisynolic acid of mp. 113–117° (hemihydrate).

[8] W. S. Johnson, D. K. Bannerjee, W. P. Schneider, C. D. Gutsche, W. E. Shelberg und L. J. Chinn, J. Amer. chem. Soc. *74*, 2832 (1952). – O. Exner, V. Šimák, J. O. Jílek und M. Protiva, Collection Czechoslov. Chem. Communs. *19*, 330 (1954).

[9] Das Spektrum wurde von Herrn Dr. E. Knobloch in der physikalisch-chemischen Abteilung unseres Institutes aufgenommen.

[10] Die östrogene Wirksamkeit wurde von Herrn Dr. V. Jelínek in der physiologischen Abteilung unseres Institutes bestimmt.

## Die Wasserbestimmung in Zellmaterial von *Saccharomyces cerevisiae* nach Karl Fischer

Im Verlaufe unserer Versuche mit Kulturweinhefen suchten wir nach Bestimmungsmethoden für Nass- und Trockengewicht, welche auch beim Vorliegen von kleinen Mengen Zellmaterial hinreichend genaue Resultate ergeben. Die Reproduzierbarkeit des Wassergehaltes von «Nasshefe» durch standardisierte Zentrifugation ist bei Hefemengen unter 1 g besonders gering[1], und die Genauigkeit der üblichen Trockensubstanzbestimmung lässt rasch nach, wenn die dabei verwendeten Glasfiltertiegel mehrmals im Gebrauch waren (vgl. auch White[1], S. 138). Da für unsere Zwecke die Wasserbestimmung nach Karl Fischer mehrere Vorteile aufweist (kleinere Probemengen, rasche Ermittlung der Resultate, Eignung für Routineanalysen), haben wir versucht, dieses Verfahren auch an feuchtem Zellmaterial von Kulturhefen durchzuführen.

### *Die Ermittlung des «Nassgewichtes»*

Die Hefezellen wurden durch ein Bakterienfilter Co 5 (Membranfilter, Göttingen) aus der Nährlösung abfiltriert und mit 2 × 20 ml Wasser auf dem gleichen Filter

[1] J. White, *Yeast Technology* (London 1954), S. 143.

nachgewaschen. Wir achteten darauf, dass am Schluss das Wasser unter reproduzierten Bedingungen abgesaugt wird, und stellten zum Beispiel das angelegte Vakuum ab, nachdem die Oberfläche der Hefeschicht eine gleichmässig matte Farbe angenommen hatte. Wie Tabelle I zeigt, können auf diese Weise sehr gut reproduzierbare Werte erhalten werden.

*Tabelle I*

Beispiel für die Reproduzierbarkeit des Wassergehaltes von nasser Hefe. Saugmethode.

| Bestimmung | Wassergehalt % | $\delta$ |
|---|---|---|
| 1 | 73,5 | −0,3 |
| 2 | 74,3 | +0,5 |
| 3 | 73,9 | +0,1 |
| 4 | 73,6 | −0,2 |
| Durchschnitt | 73,8 | 0,3 |

Wir verwenden dieses Verfahren nicht nur zur Herstellung von Zellsuspensionen bekannter Konzentration, sondern auch bei Wachstumsversuchen für die Bestimmung der gebildeten Hefemenge, da sich die Hefeschicht verlustfrei vom Filter abheben lässt.

### *Die Bestimmung des Wassergehaltes mit Karl-Fischer-Reagens*

50–80 mg der auf die oben beschriebene Art zubereiteten Nasshefe wurden abgewogen und sofort in 10 ml Methanol suspendiert. Nach 5–10 min titrierten wir mit Karl-Fischer-Lösung[2] so lange, bis der Farbumschlag mindestens 5 min erhalten blieb. Zu diesem Zwecke gibt man nach Erscheinen der ersten bräunlichen Farbtöne noch einige Tropfen zu. Versuchshalber wurde auch elektrometrisch titriert (dead-stop-Methode), doch liess sich damit keine Verbesserung im Erfassen des Endpunktes erreichen. Als Titrationsgefässe dienten 50 ml fassende, mit Aluminiumfolie zugedeckte Erlenmeyerkölbchen. Es wurde darauf geachtet, dass die Probe ungefähr die gleiche Menge Reagens verbrauchte wie die zur Bestimmung des Titers vorgelegte Wassermenge[3].

*Tabelle II*

Trockensubstanzgehalt von Zellmaterial der Kulturhefe «Herrliberg», bestimmt nach Karl Fischer bzw. nach Trocknung bei 105° C.

| Hefematerial[4] | Trockensubstanzgehalt bezogen auf das Nassgewicht in % | |
|---|---|---|
| | Karl Fischer | Trocknung 105° C |
| Kultur 3 Tage alt, Substrat *B'* . . . . . | 24,2 | 24,4 |
| Kultur 4 Tage alt, Substrat *B'*, 1. Best. . | 27,4 | 27,4 |
| Kultur 4 Tage alt, Substrat *B'*, 2. Best. . | 27,5 | 27,2 |
| Kultur 5 Tage alt, Substrat *B'* . . . . . | 29,8 | 29,1 |
| Kultur 3 Tage alt, Substrat *C* . . . . . | 24,2 | 24,4 |
| Kultur 4 Tage alt, Substrat *C* . . . . . | 28,0 | 27,3 |

[2] Von Fluka, Buchs.

[3] E. Bonauguri und G. Seniga, Z. anal. Chem. *144*, 161 (1955).

[4] Bezüglich der Substratzusammensetzung siehe T. Wikén und O. Richard, Ant. van Leeuwenhoek *17*, 209 (1951). Substrate ohne Vitaminzusatz.

Unter Verwendung von neuen Filtertiegeln 1 G 4 verglichen wir die Titrationsmethode mit den Ergebnissen der Trocknung bei 105° C (Tabelle II).

Diese Resultate zeigten, dass die titrimetrische Bestimmung durch andere Substanzen nicht gestört wird. Die Genauigkeit beträgt ± 0,5%.

### *Die Abhängigkeit des Trockensubstanzgehaltes vom Alter der Hefekulturen*

Im folgenden bestimmten wir mit der Karl-Fischer-Methode die Trockensubstanz an Zellmaterial, welches wachsenden Kulturen der Weinheferasse «Herrliberg» in 24stündigen Abständen entnommen worden war. Zu diesem Zwecke stellten wir eine Anzahl von 100 ml fassenden Erlenmeyerkolben mit je 40 ml Substrat bereit und impften mit Hilfe einer desinfizierten Mikropipette gleiche Mengen einer Suspension von 3 Tage alten Zellen. Die für die tägliche Bestimmung notwendige Anzahl Kulturkolben wurde der aufgestellten Serie wahllos entnommen. In zahlreichen Versuchen konnte beobachtet werden, dass der Gehalt an Trockensubstanz mit zunehmendem Alter beträchtlich ansteigt. Der betreffende Wert für eine bestimmte Altersstufe hängt dabei nicht nur von den Züchtungsbedingungen, sondern auch von der angewandten Impfmenge ab. Bei schwacher Impfung steigt der Gehalt im Verlaufe von 7 Tagen von etwa 20% auf über 30% an. Ist die Impfung stärker, werden die TS-Werte von 30 und mehr Prozent bereits nach 4 bis 5 Tagen erreicht. Tabelle III enthält zwei Beispiele dieses Anstieges, wenn das synthetische Substrat *B'*, bzw. natürlicher Traubensaft als Nährlösung verwendet wurden.

*Tabelle III*

Zunahme des Trockensubstanzgehaltes von «Herrliberg»-Zellen aus Kulturen steigenden Alters.

| Alter der Kultur in Tagen | % Trockensubstanz | |
|---|---|---|
| | Substrat *B'* | Traubensaft |
| 1 | 19,9 | — |
| 2 | 23,5 | 20,3 |
| 3 | 25,4 | 23,2 |
| 4 | 27,6 | 25,7 |
| 5 | 30,7 | 27,0 |
| 6 | 32,9 | 28,2 |
| 7 | 33,8 | 30,9 |

Diese Änderung des TS-Gehaltes kehrte in allen Versuchen mit einer solchen Regelmässigkeit wieder, dass die Bestimmung dieses Wertes in einer unbekannten Kultur ein gutes Mass für den Anteil an «jungen» und «alten» Zellen darstellt. Im Zusammenhang mit anderen Versuchen konnte beobachtet werden, dass die hohen TS-Gehalte von 30 und mehr Prozent stets nach der Aufnahme des assimilierbaren Zuckers auftreten. Werte von 20 bis 25% sind nur feststellbar, solange pro Volumeneinheit Substrat wenig Zellmaterial gebildet ist und die Kultur sich im Stadium der raschen Vermehrung befindet.

Wikén und Richard[5] haben in ihren Versuchen ebenfalls grosse Unterschiede im Anteil der festen Substanz bestimmen können; die Werte lagen dort je nach Alter der Kultur, Heferasse und Substratzusammensetzung zwischen 12,7 und 28,2%. Dass diese Werte als Gesamtes betrachtet bedeutend tiefer lagen, dürfte

[5] T. Wikén und O. Richard, Ant. van Leeuwenhoek *19*, 279 (1953).

darauf zurückzuführen sein, dass das Nassgewicht nach standardisierter Zentrifugation ermittelt wurde.

Die erhaltenen Befunde berühren jene Ergebnisse kaum, wo mit Zellmaterial aus mehr oder weniger ausgenützten Substraten gearbeitet wird, wie dies hauptsächlich in Bestimmungen von Hefemenge, Substratausnützung usw. für praktische Zwecke zutrifft. Dagegen erhält man fehlerhafte Resultate, wenn beispielsweise Gasumsätze ($O_2$-Aufnahme und $CO_2$-Abgabe) von ganz jungen Kulturen mit solchen von alten auf die Trockensubstanz bezogen werden. Das Nassgewicht stellt in diesen Fällen die bessere Bezugsgrösse dar (Thorne[6]). Wenn im übrigen der Trockensubstanzgehalt über die Zusammensetzung der Zelle auch keine näheren Aufschlüsse zu geben vermag, stellen die angeführten Zahlen doch einen weiteren Hinweis auf die grossen Veränderungen dar, welchen die Zelle im Verlaufe ihres Wachstums unterliegt.

A. Fiechter und U. Vetsch

*Sektion für Getränkechemie und -biologie der Eidgenössischen Versuchsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau, Wädenswil, den 10. Januar 1957.*

*Summary*

A method for the determination of wet and dry weight, has been developed which is adapted for small quantities of yeast. The wet yeast is prepared by a standardized suction filter method and titrated with Karl-Fischer solution. The dry matter content of yeast cells, harvested at daily intervals from growing cultures, changes in an increasing manner when the cultures becomes older. The values rise from about 20% to more than 30% dry matter from the second to the seventh day respectively.

[6] R. S. W. Thorne, J. Inst. Brew. *60*, 227 (1954).

## Spécificité de l'action antiphage de substances synthétiques

Dans un précédent travail[1] concernant le bactériophage de la souche *Escherichia coli* 207, nous avons rapporté qu'un certain nombre de substances possédait une action antiphage «pure», caractérisée par la différence des concentrations efficaces sur les phages et les bactéries. Afin de mettre mieux en évidence cette action antiphage «directe», il nous a semblé intéressant d'étudier comment de telles substances agiraient sur une série de bactériophages d'*Escherichia coli*, la série des types *T* par exemple.

On sait déjà que de tels phages ont un comportement différent, que certains se différencient biochimiquement, qu'on peut les différencier sérologiquement; bref, qu'ils doivent posséder des récepteurs différents. Il devrait être vraisemblable qu'ils réagissent avec différents récepteurs de la cellule.

C'est ce qu'illustre les quelques observations suivantes: Koch et Weidel[2] démontrent que la protéine (acides aminés) de la membrane d'*Esch. coli B*[3] qui joue un rôle essentiel comme récepteur vis-à-vis des phages $T_2$ et $T_6$[4], est qualitativement et quantitativement différente de la protéine de la substance réceptrice du bactériophage $T_5$. Puck et Lee[5] signalent que $T_1$ libère moins de constituants macromoléculaires de *Esch. coli B* que $T_2$, ce que pensent, d'ailleur, Zelle et Holländer[6] pour qui $T_2$ apparaît une entité plus complexe et différenciée que $T_1$. Le mécanisme de la lyse de la souche sensible dépend de la spécificité de l'agent infectant. Brown[7] a montré que les mécanismes pour $T_3$ et $T_{6r}$ apparaissent similaires, mais sont différents de celui induisant la lyse de $T_1$.

Nous avons donc entrepris des expériences avec la série des types de $T_1$ à $T_7$ correspondant à la même souche sensible *Escherichia coli* de Delbrück, afin d'étudier l'action de certaines de nos substances trouvées actives vis-à-vis du bactériophage correspondant à la souche sensible d'*Escherichia coli* 207. L'action antiphage a été caractérisée par la dose minimum de substance nécessaire pour inhiber la phagolyse des bactéries.

Nous avons employé une méthode des dilutions que nous avons adaptée à nos essais et qui nous permet de lire sur le même support la dose bactériostatique de la souche sensible, la dose phagostatique du phage correspondant ainsi que sa dose «lytique» (quantité maximum de substance permettant encore la lyse des bactéries). A des dilutions croissantes de substance, en bouillon, on ajoute des concentrations déterminées de bactériophage et de sa souche bactérienne sensible. On porte à l'étuve à 37° et on apprécie la constance de la croissance bactérienne, après des temps déterminés, pour une concentration donnée.

*Discussion;* Les résultats sont suffisamment clairs:

1° Les substances expérimentées et toutes actives sur le phage 207, ne sont pas également actives sur tous les phages de $T_1$ à $T_7$.

2° Toutes les substances expérimentées sont actives sur $T_1$.

Nous avons naturellement essayé d'obtenir la lyse de la souche *Esch. coli* 207 par $T_1$. Cela a toujours été impossible, ainsi que l'inverse, d'ailleurs, c'est-à-dire, la lyse de la souche Delbrück par le bactériophage 207.

3° Un certain nombre de ces substances sont actives sur le groupe $T_1$, $T_3$, $T_5$; pour d'autres, il s'ajoute une action sur $T_7$.

4° Toutes les substances expérimentées sont inactives sur $T_2$, $T_4$ et $T_6$.

$T_2$, $T_4$, $T_6$ semblent bien former un groupe à part. Delbrück ne peut pas les distinguer l'un de l'autre morphologiquement en employant le microscope électronique bien qu'ils soient différenciables sérologiquement. Biochimiquement, ils semblent avoir une composition très voisine.

Bien que les acides pentose nucléiques des bactéries aient une composition constante (Chargaff[8]), les acides désoxyribonucléiques des phages semblent plus hétérogènes. En effet, Wyatt et Cohen[9], ont mis en évidence que leurs acides nucléiques contiennent de l'hydroxyméthylcytosine (qui remplace la cytosine des bactéries) et que la composition de leurs bases puriques et pyrimi-

[1] L. Neipp, W. Kunz et R. Meier, Schweiz. Z. Path. Bakt. *19*, 331 (1956).

[2] G. Koch et W. Weidel, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chemie *303*, 213 (1956).

[3] W. Weidel, Z. Naturf. *6b*, 251 (1951).

[4] W. Weidel, G. Koch et F. Lohss, Z. Naturf. *9b*, 398 (1954).

[5] Th. T. Puck et H. H. Lee, J. exp. Med. *101*, 151 (1955).

[6] M. R. Zelle et A. Holländer, J. Bact. *68*, 210 (1954).

[7] A. Brown, J. Bact. *71*, 482 (1956).

[8] D. Elson et E. Chargaff, Biochem. biophys. Acta *17*, 367 (1955). – E. Chargaff, D. Elson et H. T. Shigenza, Nature *178*, 682 (1956).

[9] G. R. Wyatt et S. S. Cohen, Biochem. J. *55*, 774 (1953).

Les résultats trouvés sont condensés dans le tableau suivant:

| | Noms des substances | Activité phagostatique (en -log des concentrations) | | | | | | | | Activité bactériostatique | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 207-Phage | $T_1$-Phage | $T_2$-Phage | $T_3$-Phage | $T_4$-Phage | $T_5$-Phage | $T_6$-Phage | $T_7$-Phage | *E. coli* 207 | *E. coli* Delbrück |
| 7909 | $N_4$, $N_4'$–' bis [4″(β-diéthylamino-ethylamino)-chinazolyl(2″)]-4,4′-diamino-diphenyl-sulfone-4HCl . . . . . | 5,3 | 6,2 | 0 | 5,3 | 0 | 5,3 | 0 | 0 | 4 | 5 |
| 8048a | $N_4$, $N_4'$-bis-[2″-(β-diéthylamino-ethylamino)-4″-methyl-pyrimidyl-(2″)]-4,4′-diamino-diphenyl-sulfone-2HCl . . . . | > 4,2 | > 4,2 | 0 | > 4,2 | 0 | > 4,2 | 0 | > 4,2 | < 3 | 3 |
| 8499 | 2-[4′-methyl-benzthiazolyl-(2′)-amino]-4-(β-diéthyl-amino-ethylamino-chinazoline-2HCl . . . . . | 4,9 | 5,2 | 0 | 5,2 | 0 | 5,2 | 0 | 5,2 | 3 | 5 |
| 8636 | *p*,*p*′-Di-[4-(β-diéthylamino-propyl-amino)- chinazolyl-(2)-amino]-diphenyl-4HCl . . . . . | 5,6 | 6,5 | 0 | 5,6 | 0 | 5,6 | 0 | 0 | 5 | 5 |
| 8943 | Tétramethanesulfonate de *p*,*p*′-Di-/[4-[1′-(diéthylamino-butyl(3′)-amino]-chinazolyl-(2)-amino]-diphenyl-sulfonate . | 5,3 | 6,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 5 |
| 9238 | Bis-*p*,*p*′-[4-β-(diéthylamino-ethylamino)-7-methoxy-chinazolyl-(2)-amino]-diphenylsulfone-4HCl . . . . . | 4,5 | 5,6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | < 3 | 3 |
| 9495 | *p*,*p*′-Bis-[4-(β-diéthyl-amino)-6-methyl-pyrimidyl-(2)]-stilbène-4HCl . . . . . | 4,2 | 5,6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 |
| 11215 | 2-[4′-Phenyl-thiazolyl-(2′)-amino]-4-β-diéthylamino-ethylamino-6-amino-chinazoline-3HCl . . . . . | 4,6 | 5,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 |

diques est identique. Plus récemment, JESAITIS[10] a observé la présence d'un hexose, le glucose, sous forme de constituant de l'acide nucléique de $T_4$[11]. SINSHEIMER[12] et VOLKIN[13] le caractérisèrent aussi dans les acides nucléiques de $T_2$ et $T_6$. Enfin, tout récemment[14], JESAITIS, et ceci est fort intéressant, établit que les acides nucléiques de ces trois phages diffèrent dans leur teneur en glucose.

Le groupe $T_1$, $T_3$, $T_5$, $T_7$ semble moins homogène car même s'il n'y avait qu'une différence dans la puissance d'activité des substances étudiées sur ces phages, il n'en reste pas moins vrai qu'elle est assez marquante (9238, 9495, 11 216 n'ont pas d'action sur la phagolyse de $T_3$, $T_5$, $T_7$ à la concentration $10^{-3}$–$10^{-4}$, alors que ces substances sont toutes actives vis-à-vis de $T_1$ à une concentration inférieure à $10^{-6}$) et qu'elle traduit surtout une différence dans la résistance des phages vis-à-vis des dites substances. $T_1$ serait donc le moins résistant.

De toute façon, cette étude montre que les phages semblent se grouper au moins de 2 ou 3 manières différentes quant à leur sensibilité vis-à-vis de certains composés chimiques.

Il ressort des résultats obtenus que des différences limitées dans la structure des substances suffit, dans certains cas, à changer le spectre d'action, correspondant peut-être à la modification d'un facteur quelconque du bactériophage.

L. NEIPP, W. KUNZ et R. MEIER

*Laboratoires de Recherches du Département pharmaceutique de CIBA, Société Anonyme, Bâle, le 14 décembre 1956.*

*Summary*

The effect of synthetic antiphages has been studied against different types of bacteriophage in the same bacterium, in this case *Escherichia coli*. Most substances are active only against types $T_1$, 3, 5, 7 (and our type 207) but not against types 2, 4, 6. Others show activity only against type 1 (and our type 207). The antiphage activity of a substance therefore seems to depend upon a specific relationship between its chemical structure and that of the phage type against which it is active.

[10] M. A. JESAITIS et W. F. GOEBEL, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. *18*, 205 (1953).
[11] M. A. JESAITIS, Microbiol. Genetics Bull. No. 10, 16 (1954).
[12] R. L. SINSHEIMER, Science *120*, 551 (1954).
[13] E. VOLKIN, J. Amer. chem. Soc. *76*, 5892 (1954).
[14] M. A. JESAITIS, Nature *178*, 637 (1956).

## Änderungen des Elektrolytgehaltes von Erythrozyten und Plasma bei nephrektomierten Ratten

Der Einfluss des Ausfalls der Nieren auf den Elektrolytgehalt von Erythrozyten wurde bisher nur bei Scha-

| | | Normale Tiere | Nach Nephrektomie | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 8 h | 24 h | 48 h |
| **Plasma** | $Na^+$ | 14,30 ± 0,12 (64) | 14,51 ± 0,42 (5) | 13,48 ± 0,29 (5) | 13,75 ± 0,23 (5) |
| mAeq.% | $K^+$ | 0,54 ± 0,01 (68) | $0{,}71^{**}$ ± 0,06 (5) | $0{,}72^{**}$ ± 0,04 (5) | $1{,}02^{***}$ ± 0,06 (4) |
| | $Cl'$ | 10,92 ± 0,08 (68) | $9{,}26^{***}$ ± 0,45 (5) | $9{,}83^{**}$ ± 0,45 (4) | $6{,}00^{***}$ ± 0,81 (5) |
| **Erythro-** | $Na^+$ | 1,87 ± 0,05 (64) | $3{,}18^{***}$ ± 0,40 (5) | $2{,}40^{**}$ ± 0,18 (5) | $2{,}66^{***}$ ± 0,41 (5) |
| **zyten** | $K^+$ | 10,39 ± 0,09 (68) | 9,72 ± 1,33 (5) | $7{,}22^{***}$ ± 0,37 (5) | $5{,}50^{***}$ ± 0,31 (5) |
| mAeq.% | $Cl'$ | 5,22 ± 0,07 (68) | $3{,}82^{***}$ ± 0,90 (5) | $4{,}42^{**}$ ± 0,19 (5) | 4,84 ± 0,41 (5) |

fen untersucht[1]. Da Schafe sich aber von Menschen, Hunden und Ratten im Verhalten der Plasmaelektrolyte nach Nephrektomie wesentlich unterscheiden[2], erschien die Untersuchung der Verhältnisse bei der Ratte angebracht.

*Methodik.* 48 mit Latz-Rattenfutter (Firma Latz, Euskirchen/Rheinland) ernährte Ratten, die Wasser *ad libitum* erhielten, wurden zunächst einseitig nephrektomiert: 3 Wochen später wurde die andere Niere in Äthernarkose exstirpiert. Vorher festgelegte Gruppen von je 8 Tieren wurden 8, 16, 24, 32, 40 und 48 h nach der Totalnephrektomie in leichter Äthernarkose aus den Carotiden ausgeblutet. Blut wurde über Heparin aufgefangen und sofort zentrifugiert. Plasma und Erythrozyten wurden getrennt mit 0,75 *n* $HNO_3$ 24–48 h lang extrahiert. Im Extrakt wurden $Na^+$ und $K^+$ flammenphotometrisch, $Cl'$ merkurimetrisch[3] bestimmt.

*Ergebnisse und Diskussion.* Die Ergebnisse der Analysen von Plasma und Erythrozyten 8, 24 und 48 h nach der Nephrektomie sind in der Tabelle den bei normalen Tieren gefundenen Werten gegenübergestellt.

Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± $s\bar{x}$, in Klammern die Tierzahlen. Die Signifikanz der gefundenen Unterschiede der Mittelwerte von den Normalwerten ist durch * = $P < 0{,}05$; ** = $P < 0{,}01$ und *** = $P < 0{,}001$ bezeichnet.

Die Hyperkaliämie nach Nephrektomie ist bei Ratten nicht ganz so gross wie bei anurischen Hunden[4] und Menschen. Besonders auffällig ist dagegen der Abfall des $K^+$-Gehaltes der Erythrozyten nach Nephrektomie, der nach 24 h etwa ¾, nach 48 h etwa noch die Hälfte des Ausgangswertes beträgt. Das von den Erythrozyten nicht mehr festgehaltene $K^+$ muss sich in einem weit grösseren Flüssigkeitsvolumen als dem Gesamtplasma verteilen, da sonst die Hyperkaliämie viel stärker ausgeprägt sein müsste. Die in die Erythrozyten eindringende $Na^+$-Menge ist kleiner als die ausgetretene $K^+$-Menge. Das Eindringen von $Na^+$ in die Erythrozyten führt nicht zu einem Absinken des Plasmaspiegels; im Hinblick auf die wahrscheinliche Zunahme des Plasmavolumens bedeutet das ein Übergehen von $Na^+$ aus den Körpergeweben ins Blut. Die Veränderungen des Plasma-$Cl'$-Spiegels sind wahrscheinlich Ausdruck der Zunahme des Extrazellulärraumes.

Grundsätzlich ähnliche, aber reversible Veränderungen wie bei nephrektomierten Ratten wurden bei 2 Kindern mit akuter Anurie erhoben. Die mitgeteilten Ergebnisse werden in ausführlicherer Darstellung der Schriftleitung der Klinischen Wochenschrift zur Publikation eingereicht.

H. Brunner, G. Kuschinsky, O. Münchow und G. Peters

*Pharmakologisches Institut der Universität Mainz, 24. August 1956.*

*Summary*

After two-stage nephrectomy in rats the potassium concentration in the red blood corpuscles (RBC) decreases from 10·6 ± 0·3 to 5·5 ± 0·3 mEq per 100 ml of RBC within 48 h. The decrease is accompanied by a much smaller increase in the plasma potassium concentration; the hyperkaliemia in nephrectomized rats is less pronounced than in nephrectomized dogs or anuric humans. $Na^+$ in RBC increases by about 44% after nephrectomy; while there is only a very slight decrease of $Na^+$ in plasma. Plasma chlorides drop from 10·92 ± 0·08 mEq/100 ml of plasma to 6·00 ± 0·81 mEq % within 48 h after nephrectomy. RBC chlorides tend to increase again after an initial drop from 5·22 ± 0·07 to 3·82 ± 0·90 mEq% within the first 8 h.

## Changes in Antigenicity of Rats Spleen Cells Nuclei Resulting from Total-Body X-Irradiation

The present communication concerns the effect of X-ray irradiation upon the antigenicity of nuclei of spleen cells of rats, as well as the possible role played by deoxyribonucleic acid and deoxyribonucleoprotein in cells nuclei antigenicity.

The spleen cells nuclei have been used in experiments. Young adult rats were exposed to lethal dosis. For this purpose a 'Siemens' Roentgen apparatus operated at 220 kV, 14 mA, 3 F A1, giving a dose of 150 r/mm at the target distance of 40 cm, was used. The animals were sacrified 24 h after irradiation, and the spleen removed in the cold. The nuclei from X-irradiated and normal rats were isolated according to the method described by

[1] H. Harris, I. R. McDonald und W. Williams, Austr. J. exp. Biol. med. Sci. *30*, 33 (1952).

[2] H. Harris, I. R. McDonald und W. Williams, Austr. J. exp. Biol. med. Sci. *30*, 33 (1952). – I. R. McDonald, D. A. Coats und J. Munro, Austr. J. exp. Biol. med. Sci. *32*, 275 (1954).

[3] G. Kuschinsky und H. Langecker, Biochem. Z. *318*, 164 (1947).

[4] H. E. Hoff, P. K. Smith und A. W. Winkler, J. clin. Invest. *20*, 607 (1941).

| Spleen nuclei used for immunization | Material used for absorption | Dilutions of rabbit antisera: 1 in – | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | 1024 | 2048 |
| | | Antiserum No. 1 | | | | | | | | | | | |
| SNNR . . | unabsorbed serum | + | ++ | ++ | v | v | ++ | + | + | + | – | - | – |
| | DNA | 0 | + | + | + | + | – | – | – | – | – | – | – |
| | DNAP | 0 | + | + | + | – | – | – | | – | – | – | – |
| | | Antiserum No. 2 | | | | | | | | | | | |
| SNNR . . | unabsorbed serum | – | + | + | ++ | v | v | v | ++ | + | + | + | – |
| | DNA | 0 | + | + | ++ | + | + | – | – | – | – | | – |
| | DNAP | 0 | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| | | Antiserum No. 3* | | | | | | | | | | | |
| SNXIR . . | unabsorbed serum | – | + | ++ | ++ | ++ | + | + | – | – | – | – | – |
| | DNA | 0 | + | + | ++ | + | + | – | – | – | | – | – |
| | DNAP | 0 | + | + | ++ | + | – | – | – | – | – | – | – |
| | | Antiserum No. 4* | | | | | | | | | | | |
| SNXIR . . | unabsorbed serum | + | + | ++ | ++ | + | + | – | – | – | – | – | |
| | DNA | 0 | + | + | + | + | – | – | – | – | – | – | – |
| | DNAP | 0 | + | + | + | – | – | – | – | – | – | – | – |

All tests were done with SNNR. Controls: (a) titration of normal rabbit serum against SNNR nuclei in the cold was negative; (b) suspension of SNNR nuclei in saline kept in the cold did not show agglutination. The absorptions were done with DNA and DNAP isolated from normal spleen cells nuclei.

* Unabsorbed and absorbed antisera No. 3 and 4 were also titrated against SNXIR nuclei, but no difference in the titers could be found as compared with those obtained with SNNR.

Hogeboom *et al.*[1]. Deoxyribonucleic acid (DNA), highly polymerized, was obtained by the method of Zamenchof *et al.*[2]; deoxyribonucleoprotein (DNAP) was extracted by the method of Butler *et al.*[3], and the technique of Mirsky and Pollister[4] was employed for the separation of ribonucleoprotein (RNAP). DNA and DNAP were prepared from normal spleen cells nuclei, and RNAP from normal total organ. The concentrations of DNA, DNAP and RNAP were determined by the following methods: Ceriotti's method[5] for DNA, Sakaguchi's method[6] for DNAP and biuret method[7] for RNAP.

Male albino rabbits weighing from 2 to 2·5 kg were immunized. Their sera were titrated for antibody content prior to immunization. One group of animals received several injections of a suspension of spleen cells nuclei from normal rats (SNNR), and a second group several injections of a suspension of spleen cells nuclei from X-irradiated rats (SNXIR). Both groups of animals received equal number of spleen cells nuclei. The bleedings for antibody analyses were made ten days after the last injection. The absorption of immune rabbit sera was performed using DNA, DNAP and RNAP. In some cases, the absorptions of immune sera were also made with DNA, DNAP and RNAP obtained from normal rats liver. One volume of immune serum and one volume of DNA, DNAP or RNAP were mixed and left at 4° C for a period of 4 h, followed by a centrifugation at 4° C. The supernatants were used in tests. The agglutination was performed in small tubes (7 × 45 mm). The sera were tested by usual dilution method, using the suspension (80,000 nuclei/mm³) of SNNR. The incubation period was 16 h at 4° C. The agglutination was read microscopically. All materials used in test were kept in the cold to avoid the denaturation of DNA and DNAP.

The results are partially plotted in the Table. It seems that the SNNR have somewhat higher antigenic power, as compared with SNXIR. The results of absorptions done with DNA and DNAP pointed out that these cell constituents had a pronounced ability to absorbe anti-SNNR antibodies (antisera No. 1 and 2), but only a slight power to absorb anti-SNXIR antibodies from the sera No. 3 and 4. It seems reasonable to attribute this difference to the fact that SNNR, injected to animals, produces antibodies differing from those produced by SNXIR. From that standpoint it can be assumed that a difference in antigenicty and/or antigenic structure exists between SNNR and SNXIR. The DNA, DNAP and RNAP from normal liver cells cross-react with the anti-SNNR antibodies.

These results suggest two possible explanations regarding the inability of DNA and DNAP (isolated from normal spleen cells nuclei) to absorb anti-SNXIR antibodies. The first explanation would be that the SNXIR nuclei contain altered DNA and DNAP. Therefore, they are not capable of inducing the production of anti-spleen-nuclei antibodies which in their molecules have functional groups reacting with normal DNA and DNAP.

[1] G. H. Hogeboom, W. C. Schneider, and M. J. Striebich, J. biol. Chem. *196*, 111 (1952).

[2] S. Zamenchof, H. E. Alexander, and G. Leidy, J. exp. Med. *98*, 373 (1953).

[3] J. A. V. Butler, P. F. Davison, D. W. F. James, and K. V. Shooter, Biochem. biophys. Acta *13*, 224 (1954).

[4] A. E. Mirsky and A. Pollister, J. gen. Physiol. *30*, 101 (1946).

[5] G. Ceriotti, J. biol. Chem. *198*, 297 (1952).

[6] S. Sakaguchi, in *Practical Methods in Biochemistry*, ed. by Koch and Hankel, p. 74, 6th Ed. (Williams & Wilkins, Baltimore 1953).

[7] *Practical Methods in Biochemistry*, ed. by Koch and Hankel, p. 195, 6th Ed. (Williams & Wilkins, Baltimore 1953).

The second explanation would be that DNA and DNAP probably play an important role in the antigenicity of spleen cells nuclei. Although the evidence regarding the antigenicity of DNA and DNAP is not altogether complete, it can be assumed on the basis of present experiments that DNA and DNAP have at least hapten-like properties.

A full report will be published elsewhere.

B. D. Janković, D. T. Kanazir, D. Mančić, and M. Petrović

*Department of Immunology, Microbiological Institute, Belgrade University School of Pharmacy and Department of Biochemistry, Radiobiological Laboratory, Boris Kidrič Institute for Nuclear Sciences, Belgrade, Yugoslavia, September 22, 1956.*

*Résumé*

Les études immunologiques de l'ADN et l'ADNP, extraits des cellules normales de la rate des rats, ont demontré que ces constituants cellulaires ont au moins la propriété d'haptène.

## Amino Acid Composition of Crude and Germinated Guarseed Flour Protein (*Cyamopsis Psoralioides*)

Parikh[1] has carried out preliminary investigations on the chemical composition of Guarseed (*Cyamopsis Psoralioides*), a cheap legume grown in abundance in this part of the country. The crude Guar, even though it has a high protein content, is not used for human consumption on account of its bitter taste, high crude fibre content and the difficulty in removing the outer coating. The author was successful in easily removing the outer coating and reducing the fibre content by germinating the Guarseeds for two days before processing. An attempt is being made to investigate the nutritive value of the germinated guarseed flour, as a preliminary to which studies were carried out to determine the amino acid composition of the protein of the crude and germinated guarseed flour. The results are recorded in this communication.

*Preparation of the guar flour.* The guarseeds were obtained from the local market on a large scale, soaked for 6 h in water and washed till the washings were clear (initial washings usually contained a lot of mud and the washings were of a red colour). One portion was dried in the sun, ground in a mill and sieved through a sixty mesh sieve. The other portion was mixed with mud, and sufficient water to keep them wet was added, after which it was allowed to germinate for 48 h. After the period of germination, the seeds were dried in the sun. All the mud was removed by rubbing in a sieve and most of the skin also came away with the mud. They were again washed, dried, ground in a mill and sieved.

*Analytical methods.* For the determination of the free amino acid contents of the flour, one gram of flour was taken in 50 ml of water, homogenised for ½ h with a glass homogeniser at room temperature and centrifuged. The supernatant was used for the determinations.

For determining the total amino acids, 0·1 g of the flour was refluxed with 10 ml of 6*n* HCl for 22 h on a sand bath, the excess hydrochloric acid was evaporated under reduced pressure, the residue was mixed with water, neutralised to 6·6 pH and again evaporated and the residue thus obtained was taken in 1 ml of 10 % isopropanol and used for chromatography. For the determination of amino acids, the method used was the circular chromatographic method of Rao and Wadhwani[2] except that the chromatograms were run thrice.

The Table shows the free and total amino acid composition of crude and germinated Guar flour. It is found that in the case of the germinated Guar flour, it contains a high percentage of amino acids which gives an indication that it may be a good quality protein. Further work is in progress to study the biological value of the germinated guar flour protein.

C. V. Ramakrishnan

*Department of Biochemistry, Baroda University, India, October 8, 1956.*

[1] J. M. Parikh, M. Sc. Thesis, M. S. University of Baroda, India (1954).

[2] N. A. N. Rao and T. K. Wadhwani, J. Ind. Inst. Science *37*, (1955).

Amino acid composition of Guar Flour* (Calculated to 16 g of Nitrogen)

| | Free amino acid of | | Amino acid composition of the hydrolysate of | |
|---|---|---|---|---|
| | Crude Guar | 48 h Germinated Guar | Crude Guar | 48 h Germinated Guar |
| Cystine | – | 0·8 | 0·27 | 1·20 |
| Lysine | 9·1 | 12·3 | 10·30 | 11·80 |
| Histidine | 0·1 | 0·14 | 0·30 | 2·40 |
| Arginine | 1·2 | 2·40 | 2·05 | 3·00 |
| Aspartic acid | – | 12·20 | 10·20 | 14·80 |
| Serine | – | 1·80 | 0·50 | 1·56 |
| Glycine | 0·07 | 1·23 | 1·25 | 2·50 |
| Glutamic acid | 15·20 | 24·20 | 18·57 | 22·45 |
| Threonine | – | 1·90 | 0·30 | 2·10 |
| Alanine | 0·12 | 1·20 | 0·23 | 1·34 |
| Tryptophane | 0·10 | 0·70 | 0·31 | 0·78 |
| Tyrosine | 0·50 | 1·20 | 0·70 | 1·78 |
| Valine | 5·30 | 7·50 | 6·10 | 8·30 |
| Methionine | 3·10 | 5·60 | 4·20 | 5·80 |
| Phenylalanine | – | 0·30 | 1·04 | 1·22 |
| Leucine | 8·20 | 13·20 | 16·10 | 12·50 |
| Isoleucine | 2·10 | 10·80 | 4·20 | 10·10 |

* Nitrogen content of crude Guar flour: 5·6%.
Nitrogen content of germinated Guar flour: 6·6%.

*Zusammenfassung*

Untersuchungen über die Aminosäurezusammensetzung des Mehles von ungekeimten und gekeimten Guarsamen (*Cyamopsis Psoralioides*), die ein billiges, hochproteinhaltiges Nahrungsmittel darstellen, haben ergeben, dass die Aminosäurekombination im gekeimten Samen einer guten Proteinqualität entspricht. Die Prüfungen über den biologischen Wert dieses Mehles sind im Gange.

## Eiweissvermehrung in ein- und zweikernigen Systemen von *Acetabularia*

Gegenwart und Wirksamkeit mehrerer Kerne in einem System bewirken keine Erhöhung der Wachstumsrate des Stieles[1]. Aus diesem Ergebnis bei *Acetabularia* wurde geschlossen, dass auch keine vermehrte Synthese von Eiweisskörpern in den mehrkernigen Systemen erfolgt, da unter den angewandten Bedingungen gleiche Wachstumsgeschwindigkeit als Mass für gleiche Eiweisszunahme genommen werden kann[2]. In den im folgenden mitgeteilten Untersuchungen wurde diese Frage durch direkte Bestimmungen an ein- und zweikernigen, artgleichen und artverschiedenen Systemen geprüft.

Die Untersuchungen erfolgten an zweikernigen, artgleichen *cren*$_2$- und *med*$_2$- sowie artverschiedenen *cren*$_1$ *med*$_1$-Transplantaten, die mit den einkernigen Systemen (*cren*$_1$ und *med*$_1$) beider Arten verglichen wurden (*cren* = *Acetabularia crenulata*; *med* = *Acetabularia mediterranea*; Suffix 1 oder 2 = Anzahl Kerne in einem System). Die Transplantate wurden in üblicher Weise nach den Methoden von Hämmerling und Beth hergestellt[3]. Um vor der Hutbildung möglichst viel Stiel zu erhalten, wurden die an den Rhizoiden verbliebenen Stiele sehr kurz gehalten. Sie waren bei zweikernigen Systemen höchstens 2 × 2 mm lang (zusammen also höchstens 4 mm Stiel), bei einkernigen höchstens 4 mm lang. Die Teile wurden unter normalen Kulturbedingungen gehalten (Temperatur etwa 21°C; 12 h tägliche Beleuchtung; etwa 2500 Lux). Für die Bestimmungen wurden nur Systeme verwendet, die *ein* Regenerat ausgebildet hatten.

Der Eiweissgehalt wurde als nicht in Trichloressigsäure löslicher N bestimmt: für die Anfangswerte (Tag 0 bis Tag 14; regenerierte Stiellängen bis etwa 10 mm) kolorimetrisch nach Parnas[4], später (Tag 21 bis 36; regenerierte Stiellängen bis ungefähr 25 mm) azidimetrisch nach Sobel, Yuska und Cohen[5]. Die Bestimmungen erfolgten nur an Stielteilen von Systemen, die noch keine Hüte gebildet hatten, in mindestens drei Wiederholungen (maximal sechs) zu je 10 bis 30 Teilen.

Die Ergebnisse sind in der Abbildung zusammengefasst, wo auch die N-Ausgangswerte angegeben werden. Im folgenden sind nur die Absolutwerte der Eiweisszunahme angeführt, das heisst der absolute Zuwachs/Zeit. Die relativen Zunahmen zum Ausgangsgehalt werden nicht aufgeführt, da der Zuwachs in weiten Grenzen nicht vom Ausgangsgehalt abhängt, was unter anderem daraus hervorgeht, dass kurze, kernlose Teile der apikalen Stielregion eine grössere Proteinzunahme zeigen als längere Teile aus der basalen, rhizoidnahen Stielregion[6].

Die Zunahme der Eiweisse ist bei *cren*$_1$ und *med*$_1$ verschieden stark: *cren*$_1$ besitzt eine wesentlich höhere Syntheserate für Eiweisse als *med*$_1$. Nach 36 Tagen Versuchsdauer entsprach die absolute Eiweisszunahme bei *cren*$_1$ + *2,9* µg N/Teil, bei *med*$_1$ + *1,3* µg N/Teil. Die erhöhte Syntheserate bei *cren* steht mit der Tatsache, dass die Stiellängen bei *cren* und *med* in gleichem Masse zunehmen, nicht in Widerspruch, da *cren* dickere Stiele als *med* besitzt. Nach Beth[7] verhalten sich die Durchmesser der Stiele von *cren* zu *med* ungefähr wie 2:1. Dies muss wegen des Spitzenwachstums von *Acetabularia* zu einer stärkeren Vermehrung des Proteingehaltes bei *cren* führen. Für *cren*$_2$-Transplantate betrugen die Absolutwerte der Zunahme an Eiweiss-N nach 36 Tagen + *2,8* µg N/Teil, für *med*$_2$-Transplantate + *1,2* µg N/Teil. Demnach entspricht die Synthese von Eiweissen pro Zeiteinheit bei den zweikernigen, *artgleichen* Transplantaten der Syntheserate der einkernigen Systeme.

Für die *artverschiedenen*, zweikernigen Transplantate ergab sich, dass die Vermehrungsrate von Eiweissen nicht intermediär, sondern sehr *cren*-ähnlich war. Ihr nicht näher bestimmter Stieldurchmesser ist grösser als bei *med*. Die absolute Zunahme an Eiweiss-N nach 36 Tagen Versuchsdauer betrug + *2,4* µg N/Teil, war also nur etwas niedriger als bei *cren*$_1$ (2,9 µg N/Teil) und *cren*$_2$ (2,8 µg N/Teil).

Die gefundenen quantitativen Unterschiede in der Syntheserate für Eiweisse zwischen *cren* und *med* zeigen, dass der Grad der Eiweissvermehrung ein artcharakteristisches Merkmal ist. Bei der Untersuchung der morphologischen Merkmale von artverschiedenen *cren-med*-Transplantaten wurde zum Teil ein stark prävalentes Verhalten von *cren* festgestellt[8]. Diese Prävalenz der *cren*-Wirkung gilt nach den mitgeteilten Befunden auch für die Vermehrung von Eiweissen.

Bei Verdoppelung der Kernzahl in artgleichen Systemen erfolgt, wie bereits angeführt, keine Erhöhung der Stielwuchsrate[1] und, wie nunmehr festgestellt wurde, auch keine Erhöhung der Syntheserate von Eiweissen gegenüber einkernigen Systemen. Aus Versuchen von Werz[9] hatte sich bei zweikernigen Transplantaten jedoch eine Verkleinerung der Einzelkerne auf fast die Hälfte des Kernvolumens der einkernigen Systeme und eine Abnahme des Nukleolusvolumens auf mindestens 75% ergeben und zwar als Folge einer Verringerung der den Einzelkernen zur Verfügung stehenden, zytoplasmatischen Energiemenge. Die Tatsache, dass zweikernige Systeme nicht schneller wachsen als einkernige, zeigte bereits, dass mit der Verkleinerung der Kerne und Nukleolen eine Verringerung der Wirkungsstärken der Kerne verbunden ist: in den zweikernigen Transplantaten entspricht die Wirkungsstärke der beiden Kerne auf das Wachstum der Wirkungsstärke des einen Kernes der einkernigen Systeme. Dies gilt, wie die hier geschilderten Versuche zeigen, auch für die – indirekt (zum Beispiel [12]) – kernabhängige Synthese von Eiweissen im Zytoplasma.

[1] J. Hämmerling, Z. indukt. Abstamm. Vererbungsl. *81*, 114 (1943). – K. Beth, Z. indukt. Abstamm. Vererbungsl. *81*, 271 (1943). – H. Maschlanka, Biol. Zbl. *65*, 167 (1946). – G. Werz, Planta *46*, 113 (1955).

[2] J. Hämmerling, Z. indukt. Abstamm. Vererbungsl. *81*, 114 (1943). – G. Werz, Planta *46*, 113 (1955).

[3] J. Hämmerling, Z. indukt. Abstamm. Vererbungsl. *81*, 114 (1943). – K. Beth, Z. indukt. Abstamm. Vererbungsl. *81*, 271 (1943).

[4] J. K. Parnas, Biochem. Z. *274*, 158 (1934).

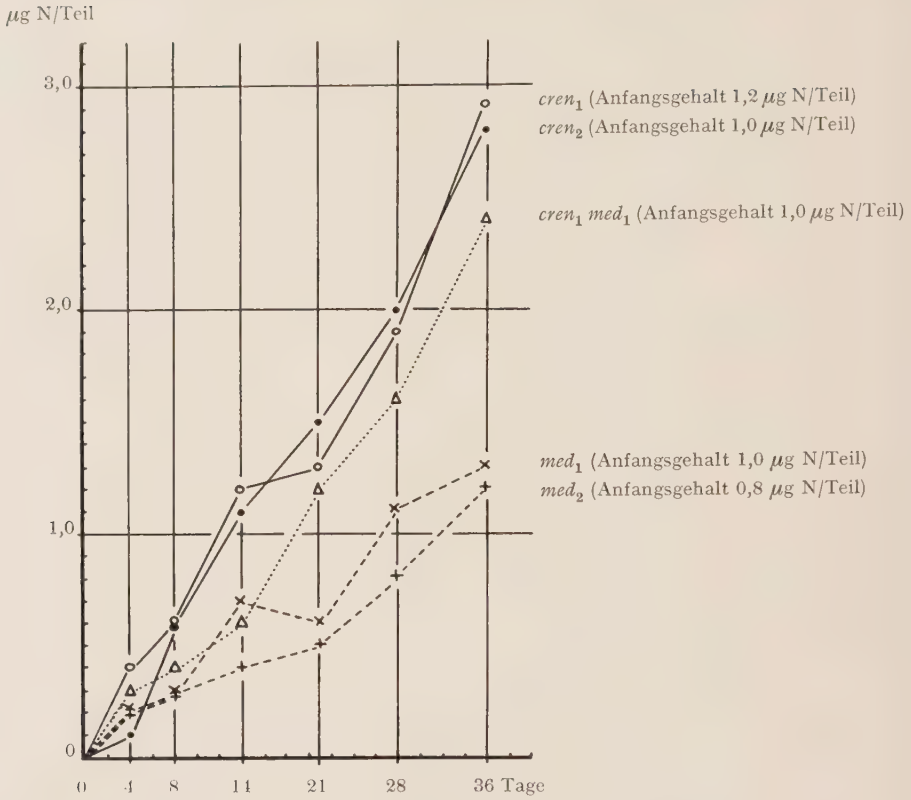
[5] A. E. Sobel, H. Yuska und J. Cohen, J. biol. Chem. *118*, 443 (1937).

[6] J. Hämmerling, 8e Congr. Intern. de Botanique, Paris; Rapport (1954), im Druck; Arch. Entwickl.-Mech. *131*, 1 (1934).

[7] K. Beth, Z. Naturforsch. *10b*, 267 (1955).

[8] J. Hämmerling, Z. indukt. Abstamm. Vererbungsl. *81*, 114 (1943). – H. Maschlanka, Biol. Zbl. *65*, 167 (1946). – G. Werz, Planta *46*, 113 (1955).

[9] G. Werz, Planta *46*, 113 (1955).




Zunahme an nicht in Trichloressigsäure löslichem N in µg N/Teil (Bezeichnungen $cren_1$, $cren_2$, $med_1$, $med_2$ und $cren_1 med_1$ siehe Text). (Tag 0 = 2. Tag nach Amputation bzw. Transplantation)

Es wäre nicht überraschend, wenn sich kleinere Unterschiede ergeben würden, da in den zweikernigen Systemen die Massenverkleinerung der Kerne nicht unmittelbar bestimmt werden kann, sondern nur ihre ungefähre Volumenverringerung. Bisher wurden jedoch solche Unterschiede nicht gefunden.

Zu Abbildung 1 sei noch angemerkt, dass die idealen Kurven in allen Systemen eine lineare Proteinzuwachsrate ergeben, womit frühere Befunde von Vanderhaeghe[10] und Brachet[11] bestätigt werden. Diese Linearität gilt jedoch nur, solange von ganzen Pflanzen mit maximalen Kernen oder ihren Regeneraten ausgegangen wird. In Zellen mit jungem, noch wachsendem Kern ist die Zunahme nicht linear (unveröffentlichte Versuche, von Hämmerling[6] bereits angeführt).

G. Werz*

*Max-Planck-Institut für Meeresbiologie, Wilhelmshaven, den 24. Oktober 1956.*

*Summary*

(1) The rate of protein synthesis was found to be different in *Acetabularia crenulata* and *Acetabularia mediterranea* the higher cytoplasmic protein synthesis in *A. crenulata* depending upon the diameter of the stalk.

(2) In systems containing one or two nuclei, there was no difference in the rate of cytoplasmic synthesis of proteins. This corresponds to the diminution of size and efficiency of the nuclei in binucleated systems.

(3) In interspecific grafts, the rate of cytoplasmic protein synthesis corresponds nearly to the rate of protein synthesis of *Acetabularia crenulata*. Corresponding to morphogenetic processes, the *cren*-action is prevalent

[10] F. Vanderhaeghe, Biochim. Biophys. Acta *15*, 281 (1954).

[11] J. Brachet, H. Chantrenne und F. Vanderhaeghe, Biochim. biophys. Acta *16*, 611 (1955).

[12] J. Hämmerling, 8e Congr. int. de Botanique, Paris; Rapport (1954), im Druck. – J. Hämmerling und H. Stich, Z. Naturforsch. *11b*, 158 (1956).

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

## Quantitative Changes of Muscle Proteins After Stimulation of the Muscle

Increase of the bulk of muscle occurring during physical training is a very well-known fact, but the mechanism of this increased proteosynthesis is not yet clear. The proteins of the muscle are considered to be metabolically not very active, according to the small incorporation of labelled amino acids into the whole muscle[1] and into isolated actine and myosine[2] which take up about 60% of all the muscle proteins. The increase of ammonia following contraction of the muscle which might point to increased catabolism of proteins is generally considered to be the result of deamination of ATP[3].

The work of Dubuisson, however, shows that stimulation of the muscle leads to a change of the muscle proteins themselves. There is a qualitative change of th

[1] H. Borsook, Physiol. Rev. *30*, 206 (1950). – M. K. Gaitond and D. Richter, Biochem. J. *59*, 690 (1955).

[2] L. E. Bidinost, J. biol. Chem. *190*, 423 (1951).

[3] J. K. Parnas and Wl. Mozolowski, Biochem. Z. *184*, 39 (1927). – A. Kleinzeller, Biochem. J. *36*, 729 (1942).

| Time after stimulation | No. of rats | Dry weight (mg) | | No. of rats | TN (mg N) | | No. of rats | Non collagen PN (mg N) | | Significant to* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Control | Stimulation | | Control | Stimulation | | Control | Stimulation | |
| Immediately | 6 | 72·3 ± 1·7 | 70·9 ± 2·2 | 6 | 10·61 ± 0·25 | 10·52 ± 0·12 | 7 | 9·45 ± 0·28 | 9·37 ± 0·26 | $P > 0{\cdot}5$ |
| 4 h . . . . . | 9 | 65·0 ± 2·6 | 67·7 ± 1·9 | 9 | 8·30 ± 0·16 | 8·65 ± 0·14 | 8 | 9·04 ± 0·18 | 9·51 ± 0·27 | $P > 0{\cdot}01$ |
| 8 h . . . . . | 6 | 63·8 ± 1·5 | 64·8 ± 2·3 | 8 | 9·36 ± 0·85 | 9·40 ± 0·85 | – | — | — | $P > 0{\cdot}5$ |

* The per cent difference between the muscles of the right and left side of the normal animal are compared with the per cent difference between the muscles of stimulated and control side.

proteins and also a change in the quantitative relations of the known proteins[4]. Moreover contractin, a protein not known in the state of rest, appears[5].

A change in the turnover of proteins after functional activity is indicated by the observation of increased proteolytic activity after stimulation of the muscle[6]. There is also an increase of amino acids in the muscle of the hind limbs of rats after running in the tread-mill[7], and finally an increase in the arterio-venous difference of non-protein nitrogen in the muscle of the hind limb of the cat after faradic stimulation of the sciatic nerve[8].

In this paper we studied the changes in the absolute amounts of muscle proteins after direct stimulation of the m. tibialis anticus of rats. The muscle was stimulated by galvanic pulses at a frequency of 300 impulses/min for 6 min. To exclude the plasma proteins, which are increased after stimulation, due to increased blood flow through the muscle, the extremities of the stimulated and the control side were perfused by Tyrode solution (37° C, oxygenated and containing 100 mg% of glucose). The time of perfusion, i.e. until clear perfusion fluid was obtained, was 15–20 min. Immediatelly, 4 and 8 h after stimulation the muscle of the stimulated and of the control side were excised and their absolute dry weight and total nitrogen content was determined. The amount of non collagen proteins was determined immediately and 4 h after stimulation with the 'Biuret method' of Gornall *et al.*[9].

There are no significant changes immediately after stimulation. However 4 h after stimulation there is an increase of dry weight by 4·1% and of total nitrogen by 4·2%.

The changes in dry weight and total nitrogen can be masked by the changes in non-protein nitrogen which in the experiments reported above increases 4 h after stimulation by 40%.

Using the Biuret method, the absolute amount of non-collagen proteins 4 h after stimulation of the muscle was therefore determined. The homogenized muscle was extracted with 0·1 *n* NaOH and the proteins where determined in the extract, using the Biuret-method[9], the accuracy of the method being 0·05 mg N. The values are expressed as milligrams of Kjeldahl's nitrogen, as the method had been calibrated with the standard Kjeldahl method. By this method, specific for proteins, an increase of 5·2% of non collagenous proteins was observed. The changes are therefore more manifest after elimination of metabolically inert[10] collagen.

This increase in the amount of proteins after stimulation of muscle is only a transient one. 8 h after stimulation of the muscle there is no longer any difference between the muscles of the stimulated and the control side.

We have therefore to deal with an overshoot reaction of similar character described in the metabolism of glycids[11] and ions[12]. It appears therefore that these overshoot reactions, following functional activity of muscle are significant for the metabolic changes taking place after training of the organism.

R. Žák, E. Gutmann, and G. Vrbovà

*Czechoslovak Academy of Sciences, Institute of Physiology, Prague, August 27, 1956.*

*Zusammenfassung*

Nach direkter Reizung des Muskels von Ratten mit einer Frequenz von 300 Impulsen/min wurde folgendes beobachtet:

a) Direkt nach Muskelreizung kommt es zu keiner statistisch signifikanten Erniedrigung von Trockengewicht, Gesamtstickstoff und Nichtkollagen-Proteinen des Muskels.

b) 4 h nach Muskelreizung erfolgt eine Erhöhung des Trockengewichts und des Gesamtstickstoffs um 4,2%, der Nichtkollagen-Proteine um 5,2%.

c) 8 h nach Muskelreizung sind die Normalwerte wiederum erreicht.

[4] M. Dubuisson, Exper. *2*, 258 (1946). – M. Dubuisson, Biochim. biophys. Acta *5*, 489 (1950).

[5] M. Dubuisson, Nature *166*, 1116 (1950).

[6] N. N. Jakovlev, Fisiol. Zhur. U.S.S.R. *34*, 717 (1948).

[7] J. W. Williams, P. E. Schur, and C. A. Elvehjem, J. biol. Chem. *182*, 55 (1950).

[8] N. K. Popova, Fisiol. Zhur. U.S.S.R. *37*, 103 (1951).

[9] A. G. Gornall, Ch. J. Bardawill, and M. M. David, J. biol. Chem. *177*, 751 (1949).

[10] A. Neuberger and J. C. Perrone, Biochem. J. *49*, 199 (1951).

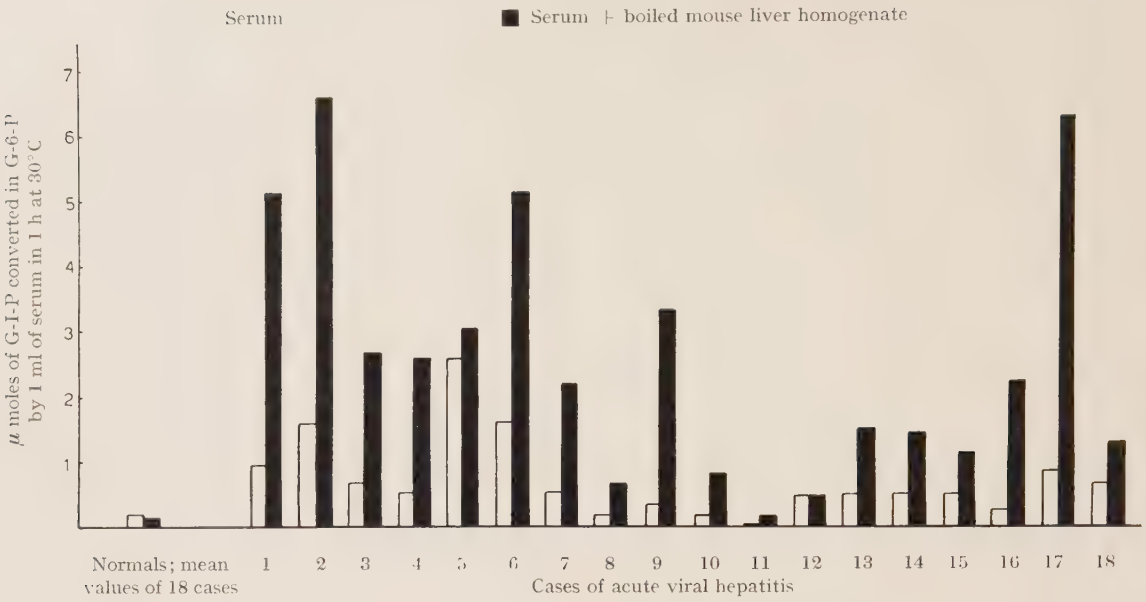
[11] L. S. Jampolskaja, Fisiol. Zhur. U.S.S.R. *37*, 110 (1951). – E. Gutmann, Z. Vodička and G. Vrbovà, Physiol. Bohemoslov. *3*, 182 (1954).

[12] Z. Drahota, personal communication.

## Serum Phosphoglucomutase Activity in Human Virus Hepatitis

We have investigated the phosphoglucomutase activity in human serum (from normal individuals and from cases of epidemic hepatitis). Phosphoglucomutase activity, as determined according to Najjar's method[1] in normal human sera (18 cases) has been found very poor

[1] V. A. Najjar, J. biol. Chem. *175*, 281 (1948).


Serum
Serum + boiled mouse liver homogenate
μ moles of G-1-P converted in G-6-P by 1 ml of serum in 1 h at 30° C
1
2
3
4
5
6
7
Normals; mean values of 18 cases
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
Cases of acute viral hepatitis

when not completely absent. In some of 18 sera of cases of acute virus (epidemic) hepatitis, this enzymatic activity has been found to be increased as compared with normal values. Furthermore, in almost all of them it is greatly increased by addition to the sera of boiled mouse liver homogenate. No such increase has been observed in normal human sera.

Homogenates in 15% concentration in $H_2O$ from mouse liver tissue (washed in $H_2O$ and then dried by filter paper) were prepared at room temperature in Potter-Elvehjem homogenizers; the homogenates were immersed for 30 s in water bath at 100°C. After centrifugation at 2000 r.p.m. for 15 min, the supernatant was separated and 0·10 ml of it was added to each test, which contained 0·2 ml of serum and was incubated for 60 min at 30°C. In each determination controls were performed with only liver homogenate and only serum. The boiled liver homogenate is devoid of any enzymatic activity.

It is assumed that during the liver necrotic process of the virus hepatitis, besides some active enzyme, a greater part of incomplete enzyme reaches the blood flow, which may then be fully activated by some unidentified compound contained in the liver tissue. Experiments are in progress to ascertain the possible identity of the activating compound contained in the homogenate with the known coenzyme of phosphoglucomutase, glucose-1,6-diphosphate.

The present observations, together with those concerning the increase in the sera of other enzymatic activities found by us and by others (alanine-ketoglutaric transaminase[2]; aspartic-ketoglutaric transaminase[3]; aldolase, phosphohexoseisomerase[4]) in cases of epidemic hepatitis and found by us in experimental virus (MHV) hepatitis (transaminases[5], phosphoglucomutase[6], fumarase[7]), emphasize the significance of the enzymatic pattern of the blood plasma in the liver virus 'necrosis syndrome' both human and experimental.

F. de Ritis, G. Giusti, and M. Coltorti

*Institute of Medical Pathology, University of Naples, Italy, November 7, 1956.*

*Riassunto*

Nell'epatite virale umana acuta l'attività fosfoglicomutasica del siero è notevolemente aumentata rispetto ai valori normali.

L'aggiunta di omogenato bollito di fegato di topo produce ulteriore notevole incremento dell'attività fosfoglicomutasica del siero di soggetti affetti da epatite epidemica; non influenza tale attività nel siero di soggetti normali.

[2] F. de Ritis, M. Coltorti, and G. Giusti, Boll. Soc. Ital. Sper. *31*, 394 (1955); Minerva Med. *46 I*, 1207 (1955); *47 I*, 167 (1956); *Communication 1er Congrès international de Pathologie infectieuse, Lyon 24–26 mai 1956*. Chimica Clinica Acta, 1957, in press.

[3] F. de Ritis, M. Coltorti, and G. Giusti, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. *31*, 394 (1955); Minerva Med. *46 I*, 1207 (1955); *47 I*, 167 (1956); *Communication 1er Congrès international de Pathologie infectieuse, Lyon, 24–26 mai 1956*. – F. Wroblewski and J. S. LaDue, Ann. int. Med. *43*, 345 (1955).

[4] F. H. Bruns, Klin. Wschr. *1954*, 1041. – F. H. Bruns and W. Jacob, Klin. Wschr. *1954*, 656. – F. H. Bruns and J. Neuhaus, Arch. Biochem. Biophys. *55*, 588 (1955).

[5] F. de Ritis, M. Coltorti, G. Giusti, Science *124*, 32 (1956).

[6] F. de Ritis, M. Coltorti, G. Giusti, Boll. Soc. It. Biol. Sper. *1956*, in press.

[7] F. de Ritis, G. Giusti, M. Coltorti, Boll. Soc. It. Biol. Sper. *1956*, in press.

## Jahreszeitliche Schwankungen der Blutgerinnung beim Hunde

In letzter Zeit wurde mehrmals festgestellt, dass die Blutgerinnung bei Tieren im Winter- bzw. Sommerschlaf langsamer verläuft (Ziesel[1], Hamster[2], Igel[3], Frosch[4], Fledermaus[5]). Wir untersuchten während einer

[1] A. Svihla, H. Bowman und R. Ritenour, Science *114*, 29 (1951).

[2] A. Svihla, H. Bowman und R. Pearson, Science *115*, 27 (1952).

[3] P. Suomalainen und E. Lehto, Arch. Soc. «Vanamo» *6*, 9 (1952).

[4] J. J. Spitzer und J. A. Spitzer, Canad. J. med. Sci. *30*, 42 (1952).

[5] D. E. Smith, Y. S. Lewis und G. Svihla, Exper. *10*, 218 (1954)

ängeren Zeitperiode (vom 1. Dezember 1954 bis 31. August 1956) die Blutgerinnung bei Hunden, und dabei konnten wir beobachten, dass auch bei dieser nichthibernisierenden Spezies jahreszeitliche Schwankungen der Blutgerinnungswerte bestehen.

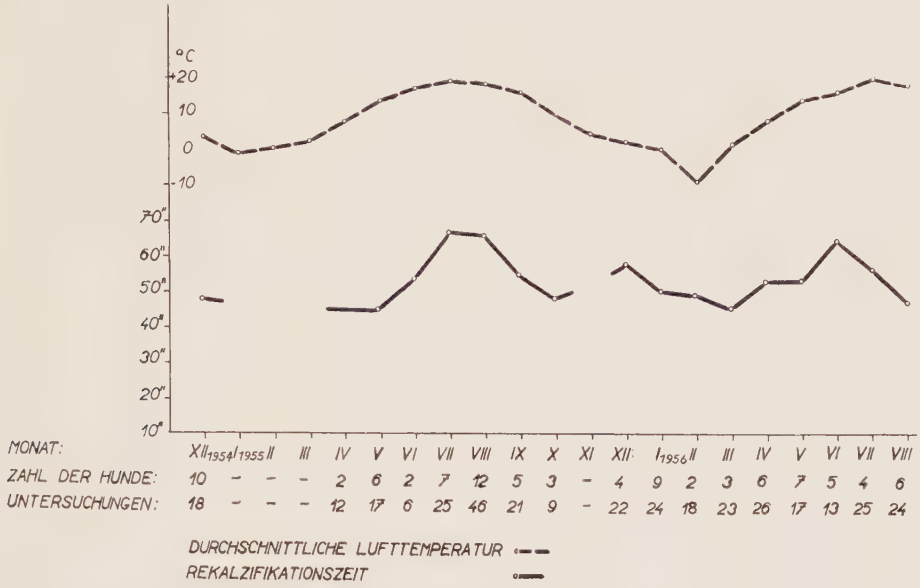

°C
+20
10
0
-10
70"
60"
50"
40"
30"
20"
10"
MONAT: XII 1954 I 1955 II III IV V VI VII VIII IX X XI XII: I 1956 II III IV V VI VII VIII
ZAHL DER HUNDE: 10 – – – 2 6 2 7 12 5 3 – 4 9 2 3 6 7 5 4 6
UNTERSUCHUNGEN: 18 – – – 12 17 6 25 46 21 9 – 22 24 18 23 26 17 13 25 24
DURCHSCHNITTLICHE LUFTTEMPERATUR
REKALZIFIKATIONSZEIT

Abb. 1. Durchschnittliche Werte (in Sekunden) der Rekalzifikationszeiten der im jeweiligen Monat untersuchten Hunde und die dazugehörigen monatlichen Lufttemperaturdurchschnitte (in C-Graden).

Wir arbeiteten mit Hundebastarden, grösstenteils männlichen Geschlechtes, 15–30 kg schwer; sie waren in einem nicht klimatisierten Hundestall untergebracht, der sie nur vor dem strengsten Frost schützte (die Innentemperatur sank nicht unter 0° C). Das Futter war während der ganzen Zeit gleich: ein Brei, gekocht aus Hundezwieback, Kartoffeln und Getreideschrot, mit Zugabe von Fleisch.

Ausser den speziellen, zur Bestimmung der jeweils notwendigen Einzelfaktoren benützten Methoden (die von einer Versuchsserie zur anderen wechselten) wurde bei allen Hunden je ein Verfahren zur globalen Bestimmung der Blutgerinnung im System des Blut-, bzw. Gewebsthromboplastins angewandt. Es handelte sich dabei um die Rekalzifikationszeit bzw. Quicksche Einstufenmethode, ausgeführt am Plasma, welches durch 5minutiges Zentrifugieren bei 2500 Touren je Minute aus Oxalatblut (0,6 ml 0,1 *m* Natriumoxalatlösung + 5,4 ml venösen Blutes) gewonnen wurde. Bei der Rekalzifikationszeit wurde die Gerinnungszeit des Gemisches 0,1 ml Plasma + 0,1 ml 0,025*m* $CaCl_2$-Lösung mit der Stoppuhr gemessen; bei der Quickschen Methode wurde vor $CaCl_2$ noch 0,1 ml einer Thromboplastinlösung aus Hundehirn zupipettiert. Die ganze Untersuchung verlief in 37° C warmen Wasserbad.

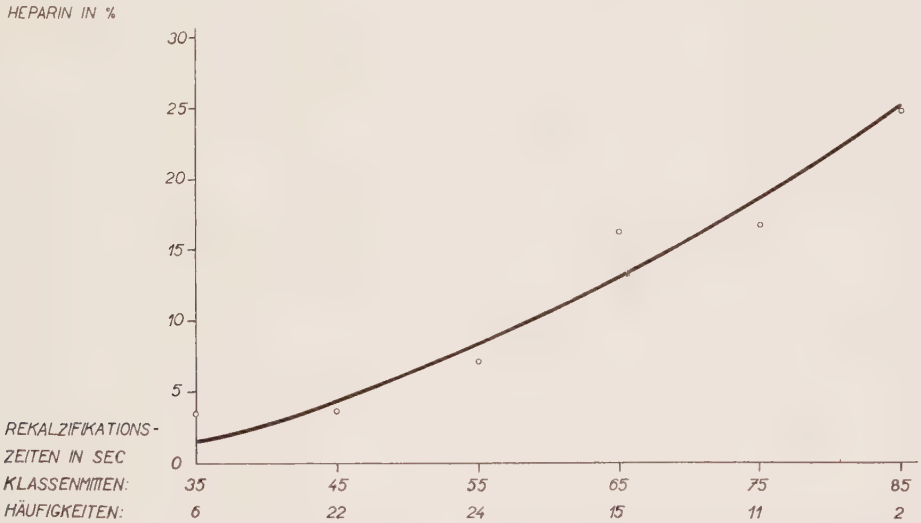



Abb. 2. Waagrecht: Rekalzifikationszeiten in Sekunden, geordnet in Klassen mit Klassengrösse 10,0 s und dazugehörende Klassenhäufigkeiten. Senkrecht: Heparin in % der Verlängerung der Thrombingerinnungszeit mit Toluidinblau.

Die Zeiten der Quickschen Methode wiesen nur unbedeutende Schwankungen auf; die Rekalzifikationszeiten jedoch – wie aus Abbildung 1 ersichtlich – waren während der Sommermonate länger als in den übrigen Beob-

| | Zeitspanne | Durchschnittliche Rekalzifikationszeit in s | $s = \pm\sqrt{\frac{\Sigma d^2}{N(N-1)}}$ | Zahl der Hunde | Zahl der Untersuchungen |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1. 12. 1954–15. 6. 1955 . . . . . | 47,1 | 1,0 | 18 | 53 |
| 2 | 16. 6.–12. 9. 1955 . . . . . | 64,8 | 1,8 | 22 | 83 |
| 3 | 13. 9. 1955–27. 5. 1956 . . . . . | 50,4 | 1,3 | 27 | 147 |
| 4 | 28. 5.–31. 8. 1956 . . . . . | 54,6 | 3,9 | 13 | 63 |

achtungsperioden. Im Dezember 1955 untersuchten wir einen Hund mit aussergewöhnlich langer Rekalzifikationszeit – über 80 s, klinische Symptome einer hämorrhagischen Diathese wurden aber nicht festgestellt. Vollständigkeitshalber wurde auch dieser in den Monatsdurchschnitt eingerechnet.

Etwaige Veränderungen der Nahrung im Sommer als Ursache dieser Verlängerung anzusehen schien uns unwahrscheinlich, da die Qualität der Futterbestandteile immer dieselbe war. Ausserdem könnte mangelhafte Ernährung eher im Winter als im Sommer in Betracht kommen. Wir suchten deshalb andere Ursachen, und es zeigte sich, dass in der Zeitspanne, in der die Rekalzifikationszeiten am längsten waren, auch die höchsten durchschnittlichen Lufttemperaturen – um 20° C – registriert wurden (siehe Abb. 1).

Dass es sich tatsächlich nicht um einen bloss kalendermässigen Zusammenhang handelt, sondern um einen Einfluss der sommerlichen Wärme, geht auch aus der nachfolgenden Tabelle hervor. Es werden darin die Gesamtdurchschnitte während der zwei warmen und kalten Perioden verglichen (die warmen Perioden werden vom Auftreten der ersten bis zum Abklingen der letzten etwa 20° C Tagesdurchschnittstemperaturen gerechnet).

Die warme Periode im Jahre 1955 hatte einen sehr gleichmässigen Verlauf (Gesamtdurchschnitt 19,4° C), es gab nur eine kurzdauernde Abkühlung (5 Tage mit Durchschnittstemperaturen knapp unter 15,0° C). Der Durchschnittswert der Rekalzifikationszeiten (2) unterscheidet sich signifikant von denjenigen der vorhergehenden und nachfolgenden Perioden (1, 3), in beiden Fällen $p < 0{,}01$. Im Jahre 1956 haben zwar die Sommerwärmen früher angefangen, der weitere Verlauf war jedoch sehr ungleichmässig, was die Temperatur anbelangt. Es waren mehrere relativ sehr kalte Zeitabschnitte (an 11 Tagen war die Durchschnittstemperatur tief unter 15,0° C), wiederum von anderen, sehr warmen gefolgt (der Gesamtdurchschnitt der Lufttemperatur war 18,5° C). Es ist deshalb verständlich, dass die Rekalzifikationszeiten (4) die grössten Schwankungen aufweisen und eine Mittelstellung im Verhältnis zu den vorher untersuchten Perioden einnehmen. Der Durchschnitt unterscheidet sich kaum signifikant von dem vorjährigen Sommerdurchschnitt (2), $0{,}02 < p < 0{,}05$, und noch weniger von den beiden kalten Perioden (1, 3), $p > 0{,}05$. Der Unterschied zwischen den beiden kalten Perioden (1, 3) ist nicht signifikant, $p > 0{,}05$.

Beim Versuch, den gerinnungsphysiologischen Mechanismus der beobachteten Verlängerung der Rekalzifikationszeiten aufzuklären, beachteten wir die Untersuchungen Perlicks *et al.*[6], wonach die langsame Blutgerinnung im Winterschlaf durch eine Zunahme des Heparins im Blute verursacht wird. Dies entspricht vollkommen den schon früher geäusserten theoretischen Erwägungen[7]. Da auch bei nichthibernisierenden Tiere Unterschiede zwischen dem Winter- und Sommerzustan bestehen – oft in entgegengesetzter Richtung als b hibernisierenden – erschien uns eine Heparinvermehrun auch als Ursache der sommerlichen Blutgerinnungsve langsamung sehr wahrscheinlich.

Wir untersuchten deshalb in den Monaten März bi August 1956 bei 80 Rekalzifikationszeiten zugleich auc das Heparin im Plasma. Es wurde die Methode vo Horn und Borsodi[8] benützt. Als Mass für die Heparin konzentration betrachteten wir die Differenz zwische der Gerinnungszeit im System 0,1 ml Plasma + 0,1 m physiologischer Kochsalzlösung + 0,1 ml Thrombin lösung (enthaltend 0,8 Einheiten des Herstellers – Firm Richter, Budapest) und im System, wo statt NaCl 0,1 m 0,01% Toluidinblau in physiologischer Kochsalzlösun verwendet wurde. Die Differenz wurde in Prozente ausgerechnet, wobei die Gerinnungszeit mit Toluidin blau als 100% betrachtet wird. Der absolute Wert de Toluidinblaugerinnungszeit war meistens 35 s.

Die Ergebnisse sind auf der Abbildung 2 dargestellt es zeigt sich tatsächlich, dass bei den langen Rekalzif kationszeiten sich mehr Heparin im Blute befindet a bei den kurzen.

V. Rosival und F. V. Seleck

*Chemisches Institut der Slowakischen Akademie d Wissenschaften, Abteilung für pharmazeutische Chemi und Biochemie, Bratislava, Tschechoslowakei, den 23. Ok tober 1956.*

*Summary*

The blood coagulation in dogs was investigated fro December 1954 to August 1956. The one-stage-metho of Quick showed no important changes, while the re calcification time was longer during the warm period in summer as compared with the previous and followin periods. In cases of prolonged recalcification time, ther was found to be an increased amount of heparin in blood

[6] E. Perlick, P. Raths und A. Bergmann, Z. ges. inn. Med. *9*, 400 (1954).

[7] R. Härmä und P. Suomalainen, Acta physiol. Scand. *24*, 9 (1951).

[8] Z. Horn und L. Borsodi, Schweiz. med. Wschr. *78*, 106 (1948).

## Mitotic Activity During Successive Migrations in the Diencephalon of Chick Embryos

*Introduction.*— Sauer[1] investigated the structure o the neutral tube wall and showed that it consists of pseudostratified columnar epithelium. When a cell i this epithelium begins mitosis, the cell nucleus migrate towards the ventricular lumen; after the cell division

[1] F. C. Sauer, J. comp. Neurol. *62*, 377 (1935).

the nucleus again migrates laterally. HAMBURGER and LEVI-MONTALCINI[2] distinguished three kinds of cell migration in the neural tube: the migration described by SAUER, a migration of cells from the neural epithelium into the peripheral layer ("the mantle") and finally the group migration of whole nerve centres. The formation of a peripheral layer, within which the definite nuclei are formed, has been described many times in the literature on the subject: PALMGREN[3] described the formation of a stratum cellulare externum peripherally to the stratum cellulare internum of the neural epithelium. BERGQUIST[4] called the migrated parts, for example, subregio tuberculi posterioris, while ROSE[5] called them pronuclei and COOPER[6] primary nuclei.

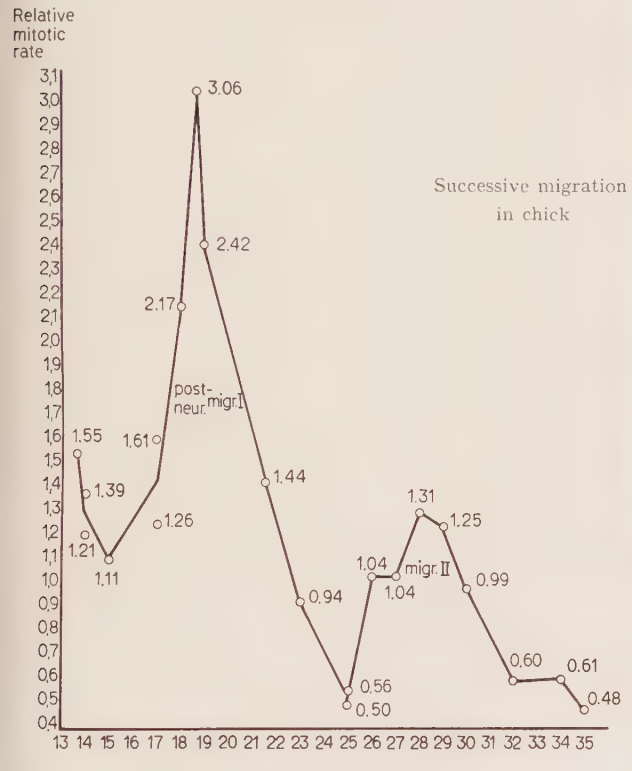



Fig. 1. – Diagram showing the relative mitotic rate in area caudalis thalami or corresponding areas in a series of chick embryos, staged according to HAMBURGER and HAMILTON[13]. Migr. I – migration layer I; migr. II – migration layer II; postneur. – postneuromere.

From HOLMGREN's[7] description of the development of the reptilian subpallium, it is apparent that at least two successive migration processes may occur. KÄLLÉN[8] discussed the phenomenon of successive migration in detail, and showed that such processes occur in the telencephalon of many vertebrates. Their importance for the homologization of the brain nuclei was emphasized. BENGMARK, HUGOSSON, and KÄLLÉN[9] described successive migration processes in the mesencephalon of mouse embryos, and BERGQUIST[10] discussed them in the diencephalon of different vertebrates. BERGQUIST and KÄLLÉN[11] illustrated with a schematic Figure (figure 6 of the paper mentioned), how the successive migration processes appear in sections and how the proliferation intensity varies.

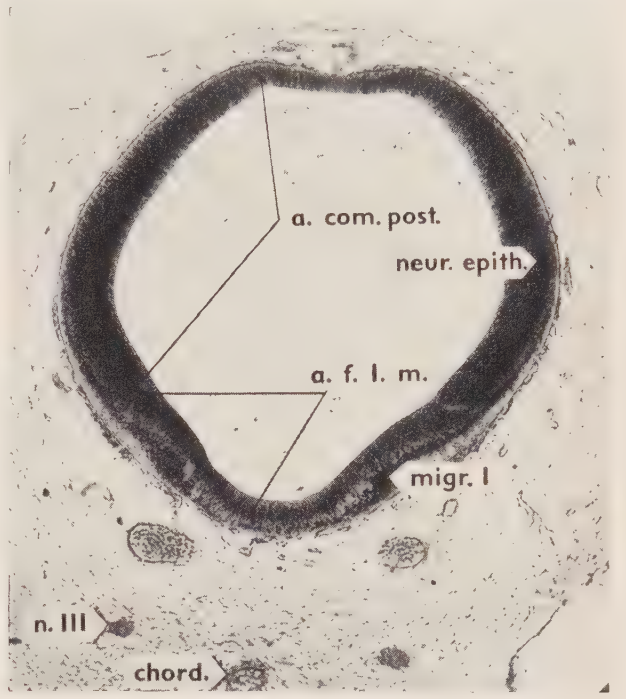



Fig. 2. – Cross section through the diencephalon of a chick embryo, stage no. 21–22, showing the migration layer (migr. I). Magnification × 65. – a. com. post. – area commissurae posterioris; a.f.l.m. – area fasciculi longitudinalis medialis; chord. – notochord; migr. I – migration layer I; N. III – nervus oculomotorius; neur. epith. – neural epithelium (= stratum matricis).

The present investigation is made with the purpose of studying the mitotic frequency at the successive stages of the migration process in order to check the above-mentioned schematic diagram of Figure 6 in BERGQUIST and KÄLLÉN's paper[12].

*Material and Methods.*—The material consists of sectioned chick embryos, supplied by the Tornblad Institute of Comparative Embryology, Lund. The stages are given according to the stage series of HAMBURGER and HAMILTON[13]. Stages between 13 and 41 were studied. During the postneuromeric phase, the mitotic counts were made on parts of the neural tube, corresponding to the future area caudalis thalami. In later stages, the counts were made in the area caudalis thalami with the immediately surrounding parts. The right side of the embryo was used. In order to identify the parts in question, graphical reconstructions were made. The mitotic frequency was studied according to KÄLLÉN's method, using the so-called relative mitotic rate. The mitotic number was thus divided with the volume of the cor-

[2] V. HAMBURGER and R. LEVI-MONTALCINI, *Some aspects of neuroembryology* (Weiss ed. Genetic Neurology, the University of Chicago Press 1950), p. 128.

[3] A. PALMGREN, Acta zool. *2*, 1 (1921).

[4] H. BERGQUIST, Acta zool. *13*, 57 (1932).

[5] J. E. ROSE, J. comp. Neurol. *77*, 61 (1942).

[6] E. R. A. COOPER, Acta anat. *9*, 201 (1950).

[7] N. HOLMGREN, Acta zool. *6*, 415 (1925).

[8] B. KÄLLÉN, J. comp. Neurol. *95*, 307 (1951); Kgl. Fysiogr. Sällsk. Lund Handl. [N. F.] *61*, 9 (1951); *62*, 5 (1951).

[9] S. BENGMARK, R. HUGOSSON, and B. KÄLLÉN, Z. Anat. Entw.-gesch. *117*, 73 (1953).

[10] H. BERGQUIST, Kgl. Fysiogr. Sällsk. Lund Handl. [N. F.] *65*, 6 (1954).

[11] H. BERGQUIST and B. KÄLLÉN, J. comp. Neurol. *100*, 627 (1954).

[12] The cost of this investigation was defrayed by grants from the Swedish Medical Research Council.

[13] V. HAMBURGER and H. L. HAMILTON, J. Morphol. *88*, 49 (1951).

responding matrix layer, as determined by planimetric measurement. Corrections for variations in cell density were made. For further details, see Källén's paper.

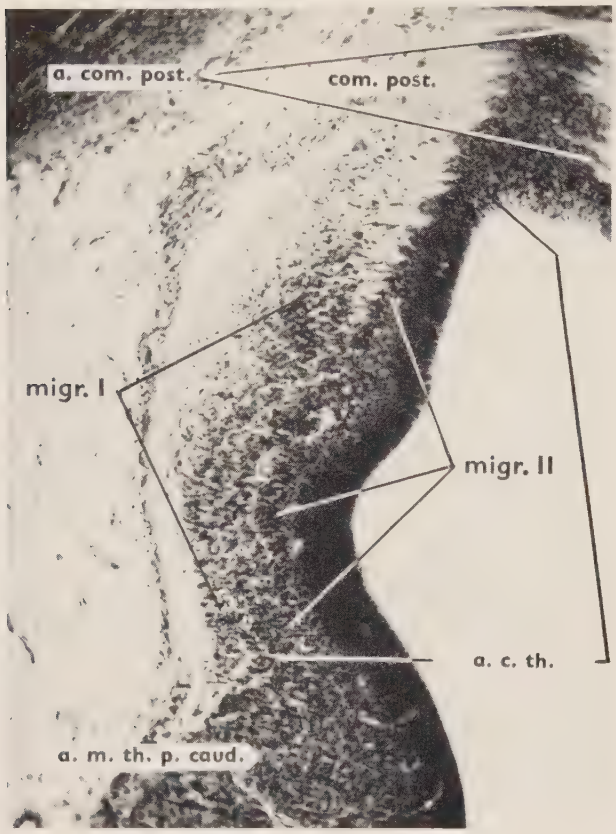



Fig. 3.—Cross section through the diencephalon in chick embryo, stage no. 29, showing the migration layer II (migr. II). Magnification < 33. – a.c.th. – area caudalis thalami; a. com. post. – area commissurae posterioris; a.m.th., p.caud. – area medialis thalami, pars caudalis; comp. post. – commissura posterior (= caudalis); migr. I – migration layer I; migr. II – migration layer II.

*Results.*—In Figure 1 the different embryonic stages are marked on the abscissa and the relative mitotic rate on the ordinate. The graph shows two maxima at stages 18–20 and 28–29, and a minimum about stage 25; the relative mitotic rate then decreases from stage 30. Corresponding to the first-mentioned maximum, the postneuromeres (= transverse bands) develop in the brain. Immediately after the maximum (stage 19) the first migration layer starts to develop (Fig. 2). Immediately after the second maximum (stage 29) the second migration layer is visible (Fig. 3). At stage 37 and later no mitotic activity occurs at the ventricular wall of the neural tube.

*Conclusions.*—The mitotic counts thus verify the relation between the proliferation processes and the successive migration, supposed to exist by Bergquist and Källén[11].

It may be emphasized that the mitotic changes accompanying the successive migration processes are strictly local processes (Bergquist[14]). These changes may therefore have a different basis than those related to the formation of neuromeric patterns, which have been further analyzed by Källén[15].

[14] H. Bergquist, J. Embryol. exp. Morphol. *4*, 152 (1956).
[15] B. Källén, Kgl. Fysiogr. Sällsk. Lund Handl. (N.F.) *26* (1956).

The migration layers are not visible until a short time after the maximum of mitotic activity. This condition is explained by the fact that the cells which are formed at the proliferation migrate lateralwards into the periphery and form there a migration layer, which is still later delimited from the ventricular neural epithelium.

H. Bergquist

*Institute of Anatomy, Medical Faculty University of Gothenburg, Sweden, October 10, 1956.*

*Zusammenfassung*

Mitosezählungen bestätigen das von Bergquist und Källén[11] angenommene Verhältnis zwischen Proliferation und sukzessiver Migration. Der Rhythmus der Mitoseaktivität, den Källén[15] im rhombenzephalen Teil des Neuralrohres während der ungleichen neuromerischen Phasen nachgewiesen hat, entspricht also einer ähnlichen Aktivität bei der sukzessiven Migration in der Area thalami.

Im Unterschied zur Mitoseaktivität in den genannten Proliferationsstadien tritt die sukzessive Migration nur lokal auf (Bergquist[14]).

Erst einige Zeit, nachdem die Mitoseaktivität ihr Maximum erreicht hat, erscheint die Migrationsschicht. Dies ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass bei der Proliferation die Zellen im Neuralepithel an der Ventrikeloberfläche entstehen, in der Ventrikelwand in lateraler Richtung wandern und sich zum Schluss in einer zusammenhängenden Migrationsschicht sammeln, die vom weiter innen liegenden Neuralepithel deutlich abgegrenzt ist.

## On the Endocrine Basis of Sexual Differences in Hexobarbital Sleeping-Time in Rats

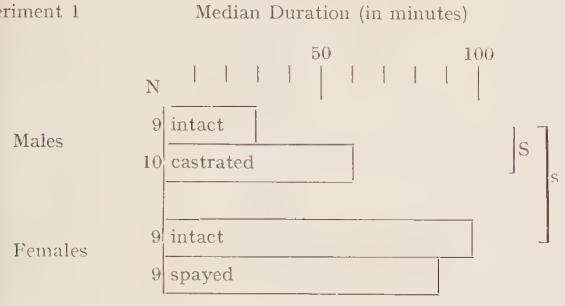
Brodie[1] has recently demonstrated that in rats there is a distinct sexual difference in the duration of hexobarbital hypnosis, females sleeping longer than males. He also showed that the administration of estradiol to intact males prolonged sleeping-time whereas testosterone shortened it in normal females. We have extended these experiments in an attempt to differentiate between the possible direct action of the hormones and their indirect actions which result from pituitary blockade and peripheral inhibitory interactions.

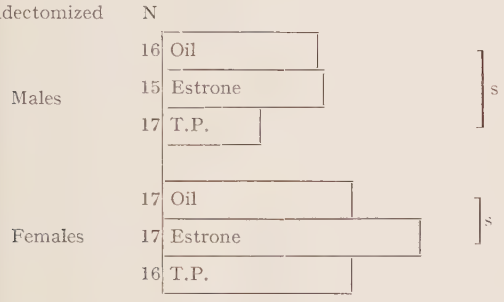
*Experiment 1.* 20 male and 20 female rats, 140–160 g body weight, from the Sprague-Dawley colony were employed. Half of the males and half of the females were gonadectomized April 6, 1956, and on May 3 all animals received 100 mg/kg hexobarbital sodium intraperitoneally. Sleeping-time was recorded as the period in min from hexobarbital injection till the return of the righting reflex.

*Experiment 2.* The intact animals from experiment 1 were gonadectomized May 7, 1956. Prior to evaluation of sleeping-time the animals were treated daily for 4 days with estrone (10 $\mu$g) or testosterone propionate (250 $\mu$g) subcutaneously; these materials were contained in 0·1 ml of corn oil which also served as a control. 24 h after the final injection the animals received 100 mg/kg hexobarbital sodium. The total number of rats of each sex was divided into three groups of about six rats each,

[1] B. B. Brodie, J. Pharm. Pharmacol. *8*, 1 (1956).

and the experiment was run on three separate occasions (18 and 25 May and 15 June). Treatment was rotated from week to week so that all animals received both compounds and served as controls.




Effects of castration and gonadal hormones on the duration of hexobarbital hypnosis in rats. $N$ = number of rats in group. $S$ = difference between bracketed groups significant at the 1% level; $s$ = difference between bracketed groups significant at the 5% level; by Wilcoson Rank Sums Method[2].

The results of the two experiments are shown in the Figure. These data confirmed the sexual difference reported by Brodie, females sleeping significantly longer than males. Castration of the males caused an increase in length of sleeping-time, so that the castrated males did not differ significantly from the normal females ($P > 0{\cdot}10$), although the median duration of sleeping time was much shorter for the castrated males. Hypnosis was shorter for spayed than for intact females, but this difference was not significant ($P > 0{\cdot}10$). This experiment was repeated on another group of rats on August 28, 2 weeks after gonadectomy. Results were essentially similar, except that the spayed females slept longer than the normal females. Median sleeping times for the four groups were: normal males 22 min, castrate males 64 min; normal females 105 min, spayed females 120 min.

In the second experiment control males and females showed essentially similar responses.

Of particular interest was the fact that testosterone propionate shortened the sleeping period of the males while estrone had no effect. In the females estrone produced a lengthening of hypnosis whereas testosterone propionate had no effect.

These data suggested that both male and female sex steroids affected hexobarbital hypnosis, but that the responses of the animals to the steroid depended upon the pre-castration state of the animal. Brodie has shown that hexobarbital metabolism resulted from enzyme concentrations in the liver which markedly differed from males to females, the latter showing a much smaller concentration. The data from the present experiments suggested that removal of the primary sources of sex steroid production resulted in an intermediate rate of hexobarbital destruction, which in normal animals is delayed by female estrogens and increased by male androgens, and that replacement therapy normalized the responses in the appropriate sex. The failure of testosterone propionate to shorten sleeping time of spayed females and of estrone to increase it in castrated males suggested that pre-castration sexual development had affected liver enzyme systems in such a way that they were capable of responding only to the hormone-type which stimulated early development[3]. If these considerations be correct then Brodie's experiments would appear to have measured pituitary blockade by testosterone in the females and by estradiol in the males or peripheral estrogen-androgen antagonism as suggested by Pellerin *et al.*[4] for pentobarbital anaesthesia.

Crevier *et al.*[5], studying pentobarbital anaesthesia, showed that the duration of hypnosis was decreased by testosterone in gonadectomized animals of both sexes whereas estradiol appeared to have little effect in ovariectomized females. Pellerin *et al.*[4] present data suggesting that progesterone may also lengthen sleeping time.

R. A. Edgren

*Division of Biological Research, G. D. Searle & Co., Chicago 80, Ill., September 4, 1956.*

*Zusammenfassung*

Die Schlafdauer ist nach Hexobarbitalbehandlung bei weiblichen Ratten länger als bei männlichen. Durch Kastrierung wird sie bei männlichen Tieren verlängert, bei weiblichen verkürzt. Bei ovariektomierten Ratten wird sie durch Oestron verlängert. Testosteron-Propionat ist wirkungslos. Bei kastrierten männlichen Ratten wird sie dagegen durch Testosteron-Propionat verkürzt während Oestron keinen Einfluss hat.

[2] F. Wilcoxon, Biom. Bull. *1*, 80 (1945).

[3] B. B. Brodie (Fed. Proc. *11*, 632 [1952]) has shown that hexobarbital localizes in the body fat, from which it is slowly released into the circulation, suggesting that the lipo-tropic effects of the sex steroids may also be involved.

[4] J. Pellerin, A. D'Iorio, and E. Robillard, Rev. canad. Biol. *13*, 257 (1954).

[5] M. Crevier, A. D'Iorio, and E. Robillard, Rev. canad. Biol. *9*, 336 (1950).

## Action of Reserpine on the 5-Hydroxytryptamine (Enteramine) Biosynthesis and Metabolism in Dogs and Rats

Shore *et al.*[1] and Pletscher *et al.*[2] have shown that reserpine produces a release of 5-hydroxytryptamine (5-HT) from the gastrointestinal mucosa, blood platelets and brain, and the contemporaneous appearance of an increased urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic

[1] P. A. Shore, S. L. Silver, and B. B. Brodie, Science *122*, 284 (1955). – P. A. Shore, A. Pletscher, and B. B. Brodie, J. Pharmacol. *116*, 51 (1956).

[2] A. Pletscher, P. A. Shore, and B. B. Brodie, Science *122*, 374 (1955); J. Pharmacol. *116*, 46 (1956).

*Table I*

| Urine collection periods | Daily urinary excretion of 5-HIAA in the rat (in μg per kg of body weight) | | |
|---|---|---|---|
| | Group *A* (10 rats) (0·1 mg/kg reserpine) | Group *B* (9 rats) (0·5 mg/kg reserpine) | Group *C* (12 rats) (1 mg/kg reserpine) |
| 1st control period | 80 (1·04) | 93 (1·43) | 67 (1·26) |
| 2nd control period | 97 (1·78) | 57 (2·16) | 86 (1·82) |
| 3rd control period | – | 104 (1·10) | – |
| Reserpine injections started | | | |
| 1st day | 106 (3·10) | 158 (2·50) | 73 (2·75) |
| 2nd day | 109 (2·50) | 176 (2·24) | 62 (2·64) |
| 3rd day | 62 (3·30) | – | – |
| 4th day | 63 (1·90) | 186 (4·20) | – |
| 5th day | 55 (3·40) | 211 (3·16) | – |
| 6th day | 105 (1·90) | – | – |
| 7th day | – | – | 119 (6·07) |
| 10th day | 70 (1·21) | – | – |
| 14th day | 69 (1·18) | – | – |
| 16th day | – | 148 (4·55) | 81 (3·34) |
| 21st day | 82 (2·54) | – | – |
| 28th day | 140 (2·00) | – | – |
| 34th day | 74 (3·10) | – | – |
| 41st day | 124 (3·55) | – | – |

The 10 rats of group *A* were killed 24 h after the 41st reserpine injection. Four rats of group *B* died after 5, 6, 9, 13 days, respectively the remainder were killed 24 h after the 16th reserpine injection. One rat of group *C* died after 10 days, 6 after 12 and 13 days, 4 after 1 and 16 days, the last was killed after the 15th reserpine injection. The 5-HT content of serum and various tissues of the rats, in term of μg free base per ml serum or g fresh tissue, was as follows:

Group *A*: Serum 0·07, spleen 0·24, gastrointestinal tract 1·61, lung 0·52, ears 0·64, snout skin 1·10, posterior paws 0·45, peritoneum 0·4
Group *B*: Serum 0·04, spleen 0·23, ears 0·47, snout skin 0·43;
Controls: Serum 0·59, spleen 2·68, gastrointestinal tract 2·47, lung 0·60, ears 1·16, snout skin 1·14, posterior paws 0·86, peritoneum 0·6

acid (5-HIAA), which is the major recognizable metabolite of 5-HT.

The observations of the above research workers were confirmed and extended by others[3] who, however, noted conspicuous species differences in the response to reserpine by the gastrointestinal tract and the brain.

For a better understanding of the mechanism of action of reserpine, it appeared interesting to investigate the rate of biosynthesis and metabolism of 5-HT following repeated administration of different doses of reserpine. This was accomplished by the estimation, in dogs and rats, of the daily urinary excretion of 5-HIAA. Th method of Udenfriend *et al.*[4] was used throughout th experiments. It gave satisfactory results in the case o dog urine, but not so in the case of rat urine. The valu given for the rat must, therefore, be considered approxi mate.

The experiments were carried out on 6 dogs, of whic only 4 gave reliable results, and on three groups o 9–12 albino rats weighing 180–230 g. After 2–3 contro collections of urine, over 24 h periods, the animals wer given daily intraperitoneal doses of 0·1, 0·3, 0·5 an

[3] V. Erspamer, Exper. *12*, 63 (1956); Naturwissenschaften *43*, 61 (1956). – P. Correale, Boll. Soc. ital. Biol. Sper. *32*, 188 (1956).

[4] S. Udenfriend, E. Titus, and H. Weissbach, J. biol. Chem *216*, 499 (1955).

*Table II*

| Urine collection periods | Daily urinary excretion of 5-HIAA in the dog (in μg per kg of body weight) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Dog 1 (0·1 mg/kg reserpine) | Dog 2 (0·3 mg/kg reserpine) | Dog 3 (1 mg/kg reserpine) | Dog 5 (1 mg/kg reserpine) |
| 1st control period | 124 (2·04) | 75 (0·79) | 64 (1·10) | 61 (1·00) |
| 2nd control period | 138 (1·43) | 102 (1·15) | 148 (1·21) | 110 (1·25) |
| 3rd control period | 144 (1·26) | – | 95 (3·20) | – |
| Reserpine injections started | | | | |
| 1st day | 221 (3·14) | 235 (4·60) | 180 (9·30) | 217 (11·60) |
| 2nd day | 136 (1·75) | 56 (3·30) | 83 (2·30) | 73 (6·60) |
| 3rd day | 130 (1·66) | 75 (4·90) | 61 (1·10) | 204 (6·80) |
| 4th day | – | died after 4 days | 41 (3·30) | died after 4 days |
| 5th day | – | | 80 (7·60) | |
| 7th day | 79 (6·88) | | died after 9 days | |
| 13th day | 107 (1·01) | | | |
| 14th day | 124 (3·92) | | | |
| 21st day | 72 (7·66) | | | |
| | died after 22 days | | | |

mg/kg of reserpine, respectively. All the doses proved o be lethal for the dogs, and the 0·5 and 1 mg/kg doses ere lethal for the majority of the rats.

The daily urinary excretion of 5-HIAA in the experiental animals is shown in the Tables I and II. In arentheses is the 5-HIAA content per ml of urine n $\mu$g).

Shore *et al.*[1], Erspamer[5], and Fischer and Lecomte[6] bserved that the rate of excretion of 5-HIAA markedly ıcreased during the first hours following the administraon of high doses of reserpine (2–5 mg/kg, intraperioneally). This was now confirmed in dogs and in group of rats.

It clearly appears, however, from the tabulated data hat, after this initial increase in the 5-HIAA urinary utput, the daily excretion of the metabolite of 5-HT eturns to normal values, in spite of the continuous adinistration of reserpine and the persistent very low evels of 5-HT in serum and spleen tissue of reserpine eated rats. An apparent, unexplained exception is roup *B* of rats in which the urinary excretion of 5-HIAA remained constantly above the normal levels.

Present results show that reserpine, even in lethal oses, does not appreciably interfere in the biosynthesis f 5-HT in the dog and rat organism. This is in accordnce with the observations of Haverback *et al.*[7], who ound that reserpine, in a dosage known to lower plateet 5-HT, did not change, in normal human subjects, he excretion of the 5-HT metabolite.

We can conclude that the only hitherto demonstrated ction of reserpine on 5-HT is that of causing a more or ess conspicuous liberation of the amine from some body epots.

5-HT creatinine sulphate and 5-HIAA were synthetizd in the Farmitalia Research Laboratories, Milan.

V. Erspamer and C. Ciceri

*Institute of Pharmacology, University of Parma, and Farmitalia S.p.A. Research Laboratories, Milan, November 3, 1956.*

*Zusammenfassung*

Wiederholte intraperitoneale Reserpindosen (0·1–1 ng/kg), die bei vielen Tieren tödlich wirken, sind beim Hund und bei der Ratte kaum imstande, die Biosynthese es 5-Oxytryptamins (Enteramin) zu beeinflussen, obwohl sie eine erhebliche Ausschüttung der Substanz us einigen Körperdepots verursachen können.

[5] V. Erspamer, Exper. *12*, 63 (1956); Naturwissenschaften *43*, 61 (1956).

[6] P. Fischer and J. Lecomte, C. r. Soc. Biol. Paris *150*, 1026 (1956).

[7] B. J. Haverback, A. Sjoerdsma, and L. L. Terry, New England J. Med. *255*, 270 (1956).

## Absence of Uricolytic Activity in Human Parotid Glands*

For the past fifty years investigators have unsuccessfully sought for an uricase in human tissues[1]. The search has been given new impetus by the observation that the amount of urate lost from the body pool is 100–250 mg greater than that excreted in the urine[2]. This finding is suggestive evidence for the presence of uricolytic activity in the body. Geren *et al.*[3] have shown that N-labelled uric acid, administered by mouth to humans, was extensively degraded, a result quite different from that obtained when the same preparation was administered parenterally. Thus, the localization of a uricase in humans may reside in either (or both) the intestinal flora or in the host tissues.

Recently Stern and Iglesias claim to have demonstrated the presence of a uricolytic ferment in human saliva and particularly in human parotid gland[4]. Their method of uricase detection was not described, nor did the authors present their scheduled paper orally at the International Physiological Congress, Montreal, 1953.

Inasmuch as the occurrence of a uricase in human tissues would be of prime importance in considerations of purine metabolism and gout we endeavored to confirm the presence of this enzyme in human parotids. Two fresh human parotid glands were minced, passed through a tissue press, homogenized and diluted with phosphate buffer. An aliquot of each suspension (equivalent to 130 mg of parotid) was incubated with urate under conditions of pH, temperature and time which permit the direct relation of uricase concentration to disappearance of urate in mammalian (other than primate) liver and kidney homogenates[5]. Urate concentration was measured by standard photometric procedures.

There was absolutely *no* disappearance of urate from the parotid tissue, urate-containing medium. Thus uricase, as determined by conventional methods is absent in human parotid. This conclusion is in keeping with the very many past failures to demonstrate uricase in any or all human tissues.

A. H. Schein

*Department of Biochemistry, College of Medicine, University of Vermont, Burlington, July 11, 1956.*

*Zusammenfassung*

In homogenisierter menschlicher Speicheldrüse liess sich entgegen den Angaben von Stern und Iglesias[4] keine Urikase nachweisen.

[2] J. D. Benedict, P. H. Forsham, and D. Stetten jr., J. biol. Chem. *181*, 183 (1949). – J. Buzard, C. Bishop, and J. H. Talbott, J. biol. Chem. *196*, 179 (1952).

[3] W. Geren, A. Bendich, O. Bodansky, and G. B. Brown, J. biol. Chem. *183*, 21 (1950).

[4] W. Stern and O. Iglesias, Abstr. XIX. Int. Physiol. Congress, Montreal, September 1953, p. 803.

[5] A. H. Schein, E. Podber, and A. B. Novikoff, J. biol. Chem. *190*, 331 (1951).

* This work was performed during the tenure of Grants A 139 and . 139–C from the National Institute of Arthritis and Metabolic Disease, Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service.

[1] W. Wiechowski, Beiträge chem. Physiol. *9*, 295 (1907); *11*, 109 (1908). – A. Schittenhelm, Z. physiol. Chem. *63*, 248 (1909). – A. A. Christman, Physiol. Rev. *32*, Suppl. 1, 333 (1952).

## Electrophysiological Investigation on the Antennal Receptors of the Silk Moth During Chemical and Mechanical Stimulation

Progress in the biochemical isolation of the sexual attracting-substance of the Silkmoth (*Bombyx mori*) was recently achieved by the use of new methods (Butenandt[1] and Hecker[2]). The extract of the attracting

[1] A. Butenandt, Naturwiss. Rdsch. (Stuttgart) *8*, 457 (1955).

[2] E. Hecker, Chem. Ber. *88*, 1666 (1955); *Verteilungsverfahren im Laboratorium* (Verlag Chemie, Weinheim 1955).

substance of *Bombyx*, as well as two other highly effective substances, cycloheptanone and sorbinol[1], proved to be suitable for investigations on insect olfactory reception. Continuing previous publications[3], the present note precedes an extensive report on the function of the antennal receptors of *Bombyx*[4]. The morphological analysis of the antenna of *Bombyx* has been completed[5].

(1) If the electrodes are attached to the base of the head and the tip of one antenna resp., or to the tips of both antennae, the resulting oscillogram is dominated by the activity of scapus and pedicellus muscles. Therefore, the impulses of the sense cells become obscured.

(2) R-C recording of impulses from the amputated antenna was done by two methods: (a) large-surface iron or Ag-AgCl needle electrodes or (b) fluid-filled capillary Ag-AgCl microelectrodes. Method (a) demonstrates summated spontaneous spikes and (b) single spontaneous spikes.

(3) Still-air stimulation of the antenna by extracted or fresh sexual attracting-substance, cycloheptanone, or sorbinol, increases the spontaneous activity. Vapors of ether or chloroform suppress the spikes.

(4) Air jets evoke electric oscillations (physiological antennal microphonics ?) in the flagellum of the antenna[6] and in the organ of Johnston.

(5) Bending of the antenna by air currents suppresses spontaneous signalling of other mechanoreceptors in the flagellum. Afterwards, spikes return with an postexcitatory burst.

(6) If an odour-containing air current hits the isolated antenna, slow electrical potential-differences between the tip and the base of the antenna are recorded. The exact form of this *electroantennogram* (EAG) was demonstrated by D-C amplification.

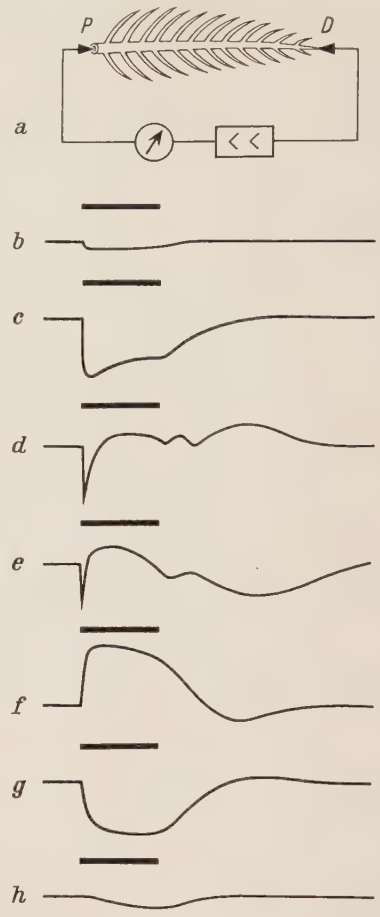
(7) The form of the EAG depends on the odour component of the air current. The amplitude of the EAG depends on the odour concentration or, if concentration remains constant, on the rate of air motion.

(8) Every odour-EAG starts with a negative on-effect (periphery of sense organ becomes negative in relation to base). During the odour current, the intermediate potential is negative for sexual attracting-substance, positive or zero for cycloheptanone and negative or zero for sorbinol. EAGs for cycloheptanone and for sorbinol cease with an off-wave. The attracting-substance-EAG slowly returns to zero after stimulation (Fig.).

(9) Vapors of ether or chloroform suppress the odour-EAG. Within 15 min after narcosis, the odour-EAGs reappear. The recovery time depends upon the deepness of narcosis.

(10) During ether- or chloroform-narcosis, air currents cause the receptors to respond with narcotics-EAGs. The form of these EAGs depends on the deepness of narcosis and the narcotic used. In the initial phase of narcosis, ether- and chloroform-EAGs are similar to the cycloheptanone-EAG (Fig. *e*). Deep ether-narcosis EAGs are either positive or negative, deep chloroform-narcosis EAGs are negative (Fig., *f* and *g*).

(11) No spikes, odour- or narcotics-EAGs are recorded, if, before amputation of the antenna, the whole breathing insect was killed by ether-, chloroform-HCN-vapor in a gas chamber (Fig., *h*).




*Bombyx*-Electroantennograms (EAGs). An air current hits the n mal or narcotized antenna. The current may or may not conta odorous substances. The duration of the current is symbolized black bars.

*a* Method: The isolated antenna is fixed between the distal (*D*) a proximal (*P*) electrodes. The electrodes are connected to a D- amplifier and oscilloscope. The EAGs (moving film) are to be re from left to right. Downward deflection of the electrone bea means that *D* becomes negative in relation to *P*.
*b* Control: Air from the laboratory compressed-air system.
*c* Air + extracted sexual attracting-substance.
*d* Air + cycloheptanone.
*e* Air during the beginning phase of ether or chloroform narcos
*f* Air during deep ether narcosis.
*g* Air during deep ether or chloroform narcosis.
*h* Reaction of the antenna of a dead moth independent of the od component of the air current or narcosis.

(12) Only the antennae of males are showing an i crease of spikes or an EAG when stimulated by t sexual attracting-substance. The antennae of both sex are responding to sorbinol and cycloheptanone.

(13) Different alcohols and other odorous substanc are giving different EAGs.

(14) The EAG contains several components of diffe ent form, time relations and polarity. Apparently t negative (initial) component inhibits the spontaneo spikes of chemoreceptors and the following positi phases facilitate them.

[3] D. Schneider, Industrie-Elektronik (Hamburg) *3*, H. 3/4, 3–7 (1955). – D. Schneider and E. Hecker, Z. Naturforsch. *11b*, 121 (1956).

[4] D. Schneider, Z. vgl. Physiologie *40* (1957), in preparation.

[5] D. Schneider and K. E. Kaissling, Zool. Jb. (Anat.) *75*, 287 (1956); *76* (1957), in press.

[6] J. Boistel and E. Coraboeuf, C. r. Soc. Biol. (Paris) *147*, 1172 (1953).

This work was supported by a research grant from the "Deutsche Forschungsgemeinschaft".

D. Schneider

*Max-Planck-Institute for Biology (Abt. Kühn), Tübingen, Germany, October 19, 1956.*

*Zusammenfassung*

Die isolierte Antenne von *Bombyx* beantwortet eine Luftreizung mit erhöhter Signalfrequenz vorher spontanaktiver und dem Signalisieren vorher ruhender Chemorezeptoren. Auf Duftströme reagiert das Sinnesorgan mit einer langsamen Potentialschwankung, dem *Elektroantennogramm* (EAG). Luftströme erregen in Schwingungsrezeptoren frequente Entladungen und löschen in Druckrezeptoren spontane Spikes aus.

## Premiers résultats d'analyse fonctionnelle électro-biochimique sur l'oreillette isolée étalée de *Scyllium canicula*

La technique de l'oreillette isolée étalée ouverte sur électrique, mise au point avec la Roussette par l'un d'entre nous et Cortot[1] permet d'observer optiquement la contraction automatique et de suivre simultanément le film de ses manifestations électriques; l'exploration chirurgicale associée à la détection électrique a rendu possible la mise en évidence d'un certain nombre de propriétés nouvelles des structures macroscopiquement différenciées les plus caractéristiques de l'oreillette de Roussette[1].

Le problème que nous nous sommes posé ici revient, en premier lieu, à examiner l'action d'*inhibiteurs rapidement réversibles* de la contraction automatique de façon à déterminer les modalités mécaniques et électriques de la *reprise* fonctionnelle dans des délais pratiques. Normalement la contraction des valvules sino-auriculaires et de la masse musculaire auriculaire se produit en phase. Nous avons été rapidement amenés à élargir la perspective de notre investigation en agissant non plus par «narco-analyse» mais à l'aide de substances pouvant produire des *dissociations* dans les phénomènes contractiles. Disons tout-de-suite que, travaillant en aérobiose, nous n'avons pu jusqu'à présent déceler d'action nette ni avec l'arséniate de sodium $10^{-2}$ *M*, ni avec l'acide monoiodacétique $0{,}4 \cdot 10^{-3}$ *M*, ni avec le fluorure de sodium $10^{-2}$ *M* (en solution $A^2$; avec NaF la solution est légèrement opalescente).

*Montage.* Le cœur est prélevé sur animal anesthésié à l'éther[2]. On place l'oreillette, munie généralement d'une partie du sinus veineux, sur un bloc de paraffine, épinglée – par une pointe à chacun des trois angles auriculaires – après avoir ouvert la préparation par sa face ventrale à partir de l'espace auriculo-ventriculaire défini par la section qui a permis l'isolement de l'oreillette. La partie *interne* de l'oreillette peut ainsi être commodément observée à la loupe binoculaire; elle montre particulièrement les deux valvules sino-auriculaires (nous dénommons l'ensemble *plastron valvulaire*) et les travées musculaires de l'oreillette dont la forte travée centrale équivalente d'un muscle papillaire. La préparation imbibée de solution *A* peut poursuivre ses contractions pendant une dizaine d'heures à 20–25° C sans qu'il soit nécessaire de lui fournir la «catalyse» d'une impulsion mécanique. Deux pinceaux pour aquarelle appliqués sur le bloc de paraffine près de la préparation sont disposés selon des axes choisis, ils assurent un dispositif de détection bipolaire très souple. Il n'est pas toujours nécessaire de pré-amplifier l'électrocardiographe (nous utilisons un appareil à inscription directe): la résistance électrique de la paraffine réduit efficacement tout court-circuit. On recouvre l'ensemble préparation-pinceaux d'un couvercle transparent. Les préparations sont facilement lavables par arrosages à la pipette et dessications périphériques au papier filtre.

*Résultats.* Nous ferons état ici des types de tracés les plus fréquents que nous avons obtenus à 25° C.

I. *Analyse par inhibiteurs rapidement réversibles*

1° *Action du gaz carbonique.* La figure 1 donne un exemple de réponse obtenue. Montage de détection: longitudinal (électrode «BG» vers le sinus). Le passage du $CO_2$ se fait sur préparation humidifiée par la solution *A* jusqu'à arrêt (contrôle électro-optique); quelques secondes sont nécessaires (si le passage du $CO_2$ se fait pendant 3–4 s, il y a seulement ralentissement du rythme (de ½ environ) sans modification apparente de la forme et de l'amplitude des potentiels d'action). N.B.: à $t_0$ la contraction est totale.

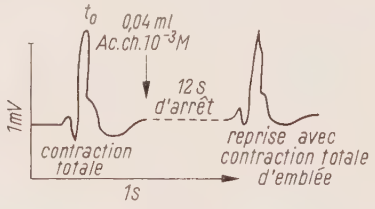



Figure 2

2° *Action de l'acétylcholine-HCl.* La figure 2 montre une réponse avec reprise totale d'emblée (montage de détection: transversal, électrode «BD» vers la valvule gauche); la figure 3 représente le film du développement de la reprise fonctionnelle avec réponse propagée (montage de détection: transversal, électrode «BG» vers le sinus légèrement à gauche); c'est un bel exemple de dis-

[1] B. Rybak et H. Cortot, C. r. Soc. Biol. (à paraître).
[2] B. Rybak, C. r. Acad. Sci. *241*, 1411 (1955).

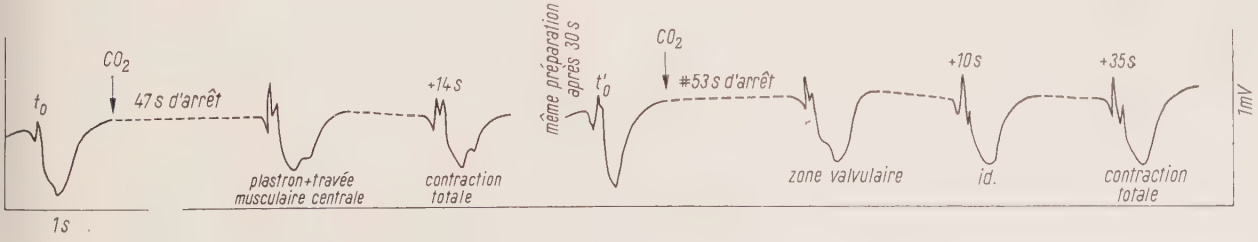



Figure 1

sociation valvulo-auriculaire, très important pour la théorie de la conduction. Cette étude montre, de plus, qu'il y a des cas d'espèce dans les réponses.

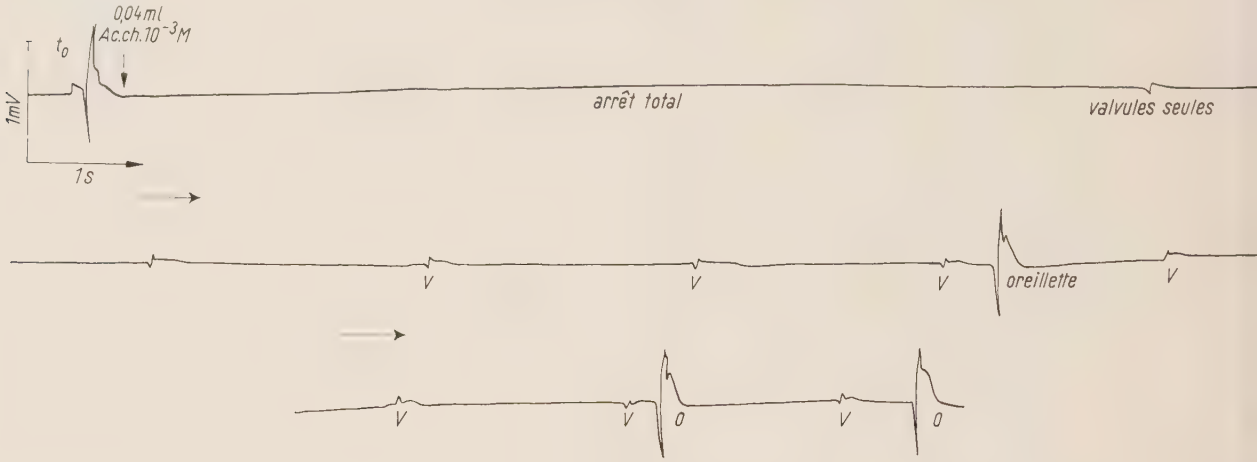



Figure 3

N.B.: 1° A $10^{-5}$ *M* et $10^{-6}$ *M*, l'acétylcholine n'amène pas la disparition de la contraction et de la production d'électricité, il se produit seulement une diminution (de l'ordre de 10%) de l'amplitude des déflexions se manifestant d'ailleurs d'une façon transitoire (pendant 5–6 contractions); 2° à $10^{-3}$ *M* l'arrêt est de 22–30 s selon les oreillettes.

II. *Analyse par substances à actions cardio-statiques différentielles*

1° *Action de l'acide adénosine-triphosphorique* (*ATP*). Nous avons trouvé que ce corps donnait lieu à des dissociations électro-mécaniques très démonstratives que reflète la figure 4.

*sinusal* (transfert du «pacemaker»?). Il se produit un séquence de 11 contractions de cette nature (en 11 s), quoi succède un arrêt total de 5 min 19 s; alors: 2° re

prise des phénomènes électro-mécaniques uniquemen sinusaux; après 30 «spikes» de cette amplitude apparais sent des «spikes» de type 3 se prolongeant 65 s puis l tracé montre des motifs de type 4. Enfin le rythme s stabilise sous la forme disloquée que montre en partie l tracé 5 et se caractérisant par une suite de 3 ondes in tercalaires sinusales pour une grande déflexion com plexe auriculaire, cet ensemble étant suivi d'un motif d type 5 constitué d'une onde intercalaire sinusale + un onde intercalaire valvulaire + une grande onde com plexe auriculaire.

2° *Action du sulfate de clupéine*. Nous avons découver que ce corps donnait lieu à des phénomènes dissociati également remarquables. Les figures 5 et 6 en offrent de exemples. La figure 5 représente les tracés essentiel

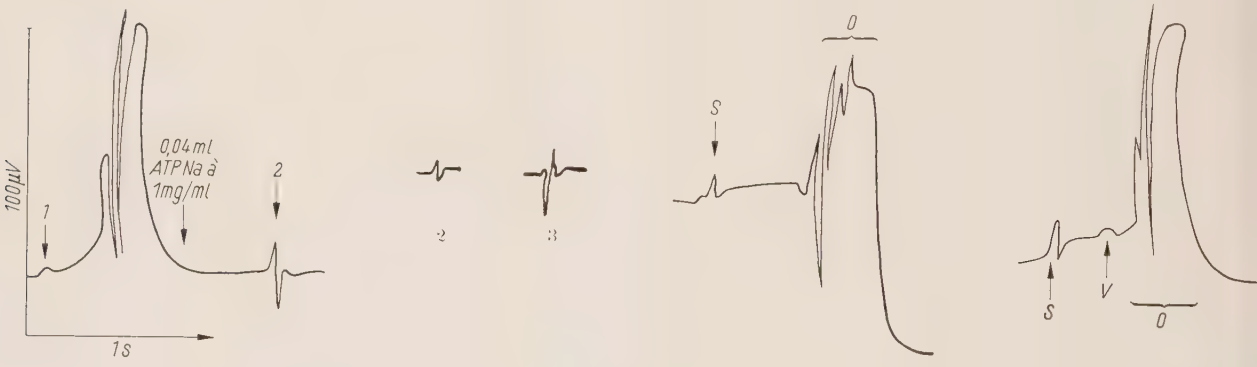
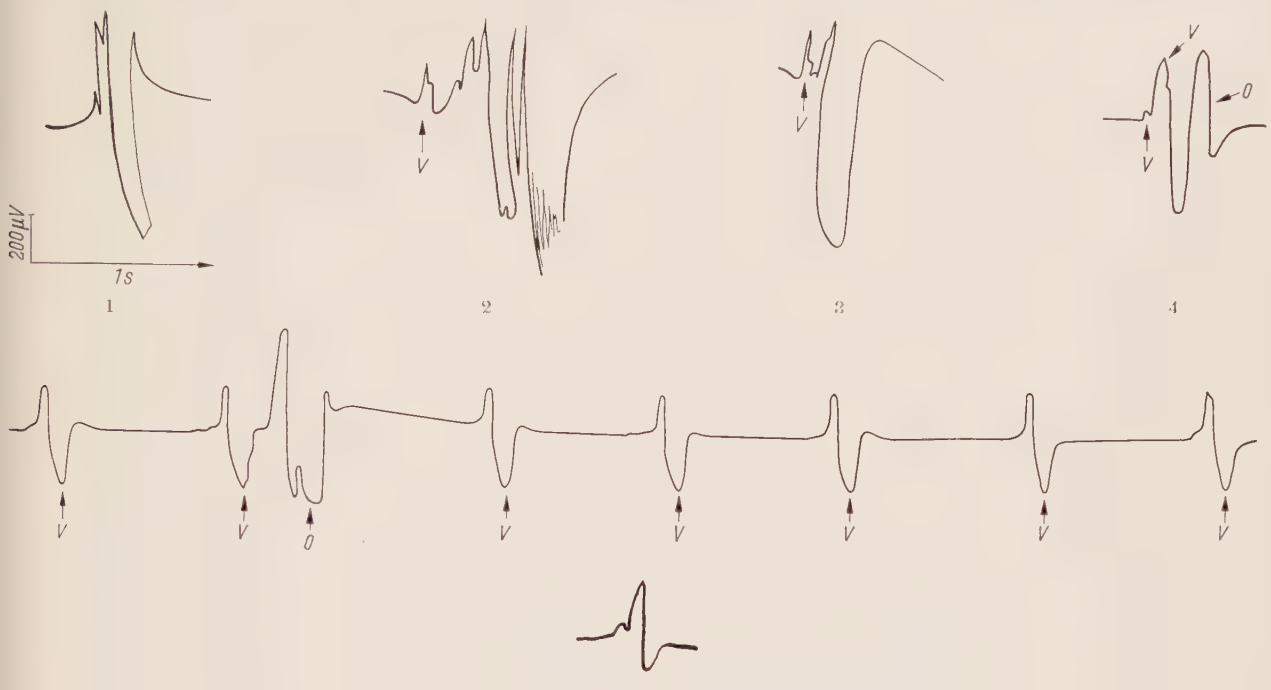



Figure 4

Tous les tracés sont dans les mêmes coordonnées que le tracé 1 (montage de détection: transversal, électrode «BD» vers la valvule gauche).

1° $t_0$ (après 0,2 ml ATP à 1 mg/ml): la flèche 1 indique l'onde associée à la contraction *sinusale* (la grande déflexion consécutive correspond à la contraction auriculaire; étant donné, d'une part, la très forte amplification destinée à révéler au mieux les ondes intercalaires et, d'autre part, le fait que la préparation avait déjà été soumise à l'action de l'ATP – d'où d'ailleurs la dissociation sinus-oreillette – il ne faut pas s'arrêter à la forme de cette grande déflexion); la flèche 2 montre l'allure instantanée que prend le potentiel d'action après adjonction de 0,04 ml d'ATP: *ce «spike» est uniquement* d'une expérience qui s'est déroulée dans les condition suivantes: montage de détection: transversal (électrod «BD» vers la valvule gauche) 1° $t_0$ (tous les tracés sont la même échelle); 2° après adjonction de 0,68 ml d clupéine-$SO^{4-}$ à 1 mg/ml distribué en 33 min, la contrac tion de l'oreillette montre un léger décalage sur la cor traction des valvules; 3° autre type de réponse; 4° aprè 0,24 ml de clupéine en supplément et un lavage par l solution *A* (en 26 min après le stade 3); on notera que contractions des valvules (une de la droite et une de l gauche) précèdent une seule contraction de la mass auriculaire; 5° dissociation valvuloauriculaire 12 mi après 4°; 6° finalement, contractions uniquement va vulaires de la forme représentée ici.

La figure 6 montre une autre modalité des dissociations électro-mécaniques obtenues avec la clupéine-$SO^{4--}$ à 1 mg/ml. 1° $t_0$ (montage de détection: longitudinal, l'électrode «BD» vers le sinus); 2° $t'_0$ (montage de détection: transversal, l'électrode «BD» vers la valvule gauche); 3° on a ajouté 0,12 ml de clupéine en 4 min: l'oreillette ne se contracte plus et le rythme électro-mécanique est uniquement dû au sinus et aux 2 valvules, celles-ci se contractant en phase (montage transversal comme en 1°).




1 2 3 4

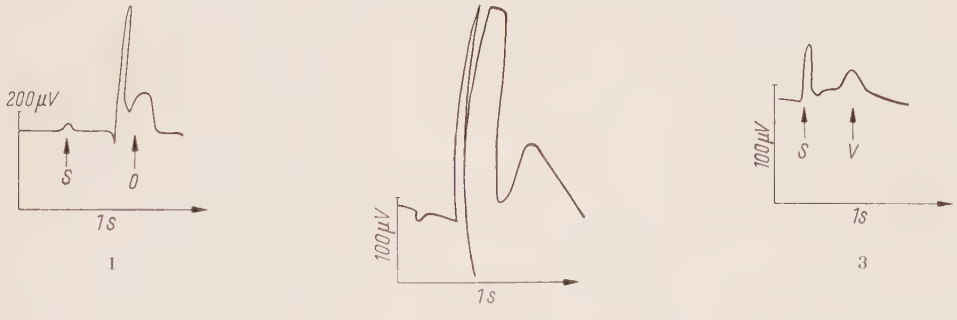
5

Figure 5

mander si, dans les tracés complets à sommets PRT livrés par le sinus veineux de grenouille[3] l'onde P n'est pas associée à la contraction d'une partie des veines caves déphasée sur la contraction sinusale proprement dite. Des expériences en cours montreront ce qu'il en est.

B. Rybak, M. Bécuwe et P. Bécuwe

*Laboratoire Arago, Banyuls-sur-mer et Laboratoire de Physiologie générale, Faculté des Sciences, Bordeaux, le 29 octobre 1956.*




1 2 3

Figure 6

*Discussion.* C'est une manière de pathologie cardiaque expérimentale immédiatement accessible que nous avons pu promouvoir. On ne devra d'ailleurs pas s'arrêter pour l'instant à la forme intrinsèque des ondes mais à leur séquence et à leur pérennité après perturbations. D'une façon générale il ressort de cette première étude que la musculature auriculaire paraît se «fatiguer» plus vite que la musculature valvulaire. Par ailleurs l'obtention, chez la Roussette, de la précession d'une onde sinusale ou valvulaire de petite amplitude nettement séparée de l'onde auriculaire de grande amplitude conduit à se de-

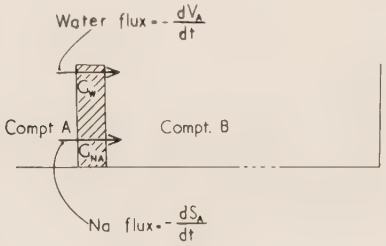
*Summary*

A new method is described for studying the auricular automatism using quickly reversible inhibitors and dissociators of electrical and mechanical process. By means of carbon dioxide, acetylcholine, adenosine-triphosphoric acid and clupeine-sulfate, it has been found that the valve muscle is more resistant than the auricular muscle.

[3] B. Rybak et J. Retail, Exper. *12*, 438 (1956).

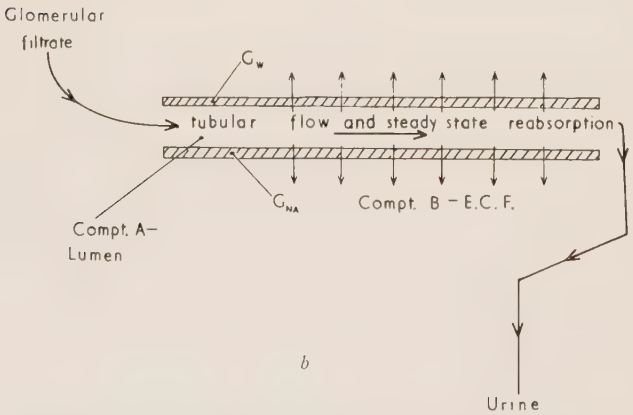
## A Theoretical Consideration of the Interaction of Antidiuretic Hormones and Sodium Retaining Hormones in the Kidney

The transfer of Na and water across frog skin has been studied in some detail and it seemed possible that the renal tubular processes might be not entirely dissimilar. A model 'renal tubule' is proposed in which the permeability of the tubule wall to water would be increased in the presence of anti-diuretic hormone (A.D.H.) and in which sodium reabsorption would be an active process, as envisaged by Ussing and Zerahn[1], controlled by a sodium retaining hormone (S.R.H., possibly a mineralocorticoid). We do not propose to discuss the morphology of the renal tubule or of its reabsorptive processes. We will assume that the factors characterizing the reabsorption of water and sodium are constant over the whole length of the tubule. In this case it may be shown that the above system is analogous to a tank of saline divided into two compartments $A$ and $B$ by a membrane permeable to both sodium and water in one direction and impermeable to both in the opposite direction. The permeability of the membrane to water is considered to be controlled by A.D.H., and the transfer of Na to depend upon the activity of a sodium pump (controlled by S.R.H.) acting across the membrane.




*a*

Fig. 1 *a*. — Representing Na and water fluxes between two compartments, $A$ and $B$, separated by a membrane whose permeabilities to Na and water are $G_{Na}$ and $G_w$ respectively. $S_A$ is the quantity of sodium in $A$; $V_A$ the volume of water in $A$.




*b*

Fig. 1 *b*. — Representing a simplified model of a renal tubule whose reabsorptive properties are uniform over the whole of its length.

In the absence of forces across the membrane other than those due to difference in sodium concentration between compartments $A$ and $B$ we have:

Force tending to transfer Na from $A$ to $B$

$$= K\left\{ Ln\,\frac{S_A(t)}{V_A(t)} - Ln\,\frac{S_B(t)}{V_B(t)} \right\}$$

and force tending to transfer water from $A$ to $B$

$$= K\left\{ Ln\,\frac{S_B(t)}{V_B(t)} - Ln\,\frac{S_A(t)}{V_A(t)} \right\}.$$

Thus the fluxes of sodium and water $i_{Na}$ and $i_w$ respectively, are given by:

$$i_{Na} = \begin{cases} K\left\{ Ln\,\frac{S_A(t)}{V_A(t)} - Ln\,\frac{S_B}{V_B} \right\} G_{Na} & \text{if } \frac{S_A}{V_A} > \frac{S_B}{V_B}\,; \\ 0 \text{ if } \frac{S_A}{V_A} \leqslant \frac{S_B}{V_B}\,. \end{cases} \quad (1)$$

$$i_w = \begin{cases} K\left\{ Ln\,\frac{S_B}{V_B} - Ln\,\frac{S_A(t)}{V_A(t)} \right\} G_w & \text{if } \frac{S_B}{V_B} > \frac{S_A}{V_A}\,, \\ 0 \text{ if } \frac{S_B}{V_B} \leqslant \frac{S_A}{V_A}\,. \end{cases} \quad (2)$$

The system tends to an equilibrium condition in which

$$\left( \frac{S_A}{V_A} = \frac{S_B}{V_B} \right)$$

whatever the initial concentration in $A$.

In the presence of $E_{Na}$ and $P$ the equations (1) and (2) defining sodium flux and water flux become:

$$i_{Na} = \begin{cases} \left[ E_{Na} + K\left\{ Ln\,\frac{S_A(t)}{V_A(t)} - Ln\,\frac{S_B}{V_B} \right\} \right] G_{Na} \\ \qquad \text{if } \left[ E_{Na} + K\left\{ Ln\,\frac{S_A(t)}{V_A(t)} - Ln\,\frac{S_B}{V_B} \right\} \right] > 0\,; \\ 0 \text{ if } E_{Na} + K\left\{ Ln\,\frac{S_A(t)}{V_A(t)} - Ln\,\frac{S_B}{V_B} \right\} \leqslant 0\,; \end{cases} \quad (3)$$

$$i_w = \begin{cases} \left[ P - K\left\{ Ln\,\frac{S_A(t)}{V_A(t)} - Ln\,\frac{S_B}{V_B} \right\} \right] G_w \\ \qquad \text{if } \left[ P - K\left\{ Ln\,\frac{S_A(t)}{V_A(t)} - Ln\,\frac{S_B}{V_B} \right\} \right] > 0\,; \\ 0 \text{ if } \left[ P - K\left\{ Ln\,\frac{S_A(t)}{V_A(t)} - Ln\,\frac{S_B}{V_B} \right\} \right] \leqslant 0 \end{cases} \quad (4)$$

respectively.

*Table I.*

| | |
|---|---|
| $V_A(t)$ | Volume of water in compartment $A$ at time $t$. |
| $V_B(t)$ | Volume of water in compartment $B$ at time $t$. |
| $S_A(t)$ | Quantity of sodium in compartment $A$ at time $t$. |
| $S_B(t)$ | Quantity of sodium in compartment $B$ at time $t$. |
| $G_{Na}$ | Membrane permeability to sodium in direction $A \rightarrow B$ assumed independent of flux. |
| $G_w$ | Membrane permeability to water in direction $A \rightarrow B$ assumed independent of flux. |
| $i_{Na}$ | Sodium flux in direction $A \rightarrow B$. |
| $i_w$ | Water flux in direction $A \rightarrow B$. |
| $E_{Na}$ | Electromotive force developed by the membrane sodium pump in direction $A$ to $B$. |
| $P$ | Force favouring water transfer in direction $A$ to $B$ (e.g. hydrostatic pressure difference). |

Further let $V_B \gg V_A$ so that the error in taking $V_A + V_B = V_B$ may be neglected.

[1] H. H. Ussing and K. Zerahn, Acta physiol. scand. *23*, 110 (1956).

*Table II.* Values of constants and parameters.

| | |
|---|---|
| $\alpha$ | $S_A/V_A$ in the steady state. |
| $G_w$ | is a parameter: with a NaCl ratio of 1:10 across frog-skin, the water flux is about 10 $\mu$l/cm$^2$/h. (Koefoed-Johnson and Ussing, 1953; Capraro and Garampi, 1956). From these figures, $G_w$ may be ex-expressed as a membrane conductivity of $4{\cdot}6 \times 10^{-8}$ ml/s/cm$^2$/mV. In presence of A. D. H. $G_w$ may be more than doubled. |
| $E_{Na}$ | is a parameter: Ussing and Zerahn (1951) give values of about 70 mV for frog-skin. |
| $K$ | is a constant and $= RT/nF$ where $n = 1$ and is taken as 26·6 mV. |
| $G_{Na}$ | is the same as $k_{Na}$ used by Ussing and Zerahn (1951) and is equal to $6{\cdot}2 \times 10^{-9}$ mEq/s/cm$^2$/mV. |
| $P$ | is a parameter of the system given, for convenience, in millivolts. |

It may be shown that if either or both $P$ and $E_{Na} > 0$ no equilibrium condition exists but that a steady state exists in which $i_w$ and $i_{Na}$ take *non-zero* values such that

$$\frac{S_A(t)}{V_A(t)}$$

remains constant. In this case it may be shown that

$$\frac{i_{Na}}{i_w} = \frac{S_A}{V_A} = \alpha\,, \qquad (5)$$

where $\alpha$ is a constant.

Hence eliminating $i_{Na}$ and $i_w$ between equations (3), (4) and (5) we have

$$Ln\,\frac{S_A(t)}{V_A(t)} = Ln\,\frac{S_B}{V_B} + \frac{\alpha P G_w - E_{Na} G_{Na}}{K\{G_{Na} + \alpha G_w\}} \qquad (6)$$

which defines the steady state.

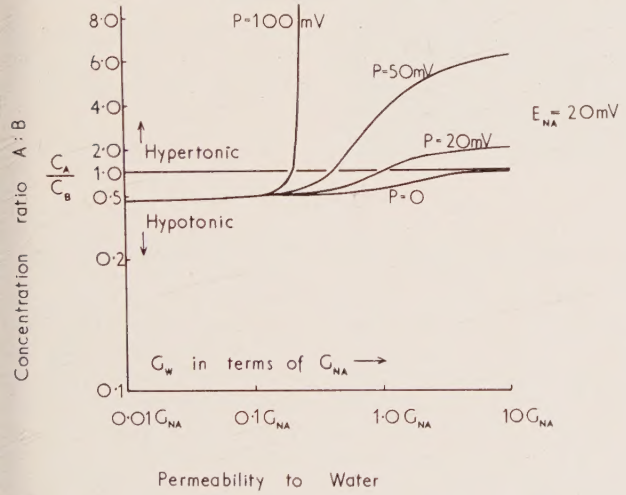



Fig. 2*a*.—The effect of $P$ upon the steady-state concentration ratio between $A$ and $B$ ($C_A/C_B$), plotted as a function of $G_w$ with $E_{Na}$ = 20 mV.

It may be seen from the Figures 2*a* and 2*b*, which are graphs of

$$\frac{S_A/V_A}{S_B/V_B}$$

plotted as a function of $G_w$ with $E_{Na}$ and $P$ as parameters, that the concentration ratio across the membrane

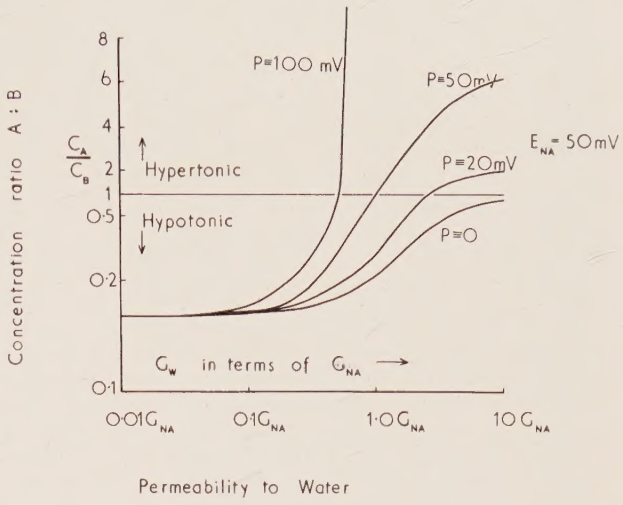



Fig. 2*b*.—The effect of $P$ upon the steady-state concentration ratio between $A$ and $B$ ($C_A/C_B$), plotted as a function of $G_w$ with $E_{Na}$ = 50 mV. For details of parameters in these figures, see text.

in the steady state is, for any given $P$, a function of both $E_{Na}$ and $G_w$. This is the phenomenon of interaction.

A thorough examination of equation (6) reveals facts which may be shown to correspond to certain physiological findings as discussed below:

(1) If sodium reabsorption ($E_{Na}$) be reduced, the equation reveals that the condition favours increased water excretion. This is evident in the case of mercurial diuretics[2].

(2) When water reabsorption is reduced (e.g. $G_w$ is reduced due to fall of A.D.H. level) sodium excretion may be increased, as is found in water diuresis or hypotonic saline diuresis[3].

(3) If both A.D.H. and S.R.H. are decreased (so that $G_w$ and $E_{Na}$ are both low) neither pitressin nor a mineralocorticoid, administered separately, would be expected greatly to modify the pattern of excretion. This appears to be the case in iso and hypertonic saline diuresis, where the increased water excretion is not significantly inhibited either by pitressin or by deoxycorticosterone esters[4].

D. F. Cole and J. F. Meredith

*Department of Medicine and Department of Electrical Engineering, King's College, Newcastle upon Tyne, England, June 9, 1956.*

*Zusammenfassung*

In dieser Arbeit ist eine Theorie der Nierenfunktion entwickelt worden, welche eine Wechselbeziehung zwischen den antidiuretischen und natriumretendierenden Hormonen aufzeigt. Durch diese Theorie werden einige bisher nicht verständliche Phänomene der Nierenphysiologie erklärt.

[2] R. F. Pitts and O. W. Sartorius, Pharmacol. Rev. *2*, 161 (1950).

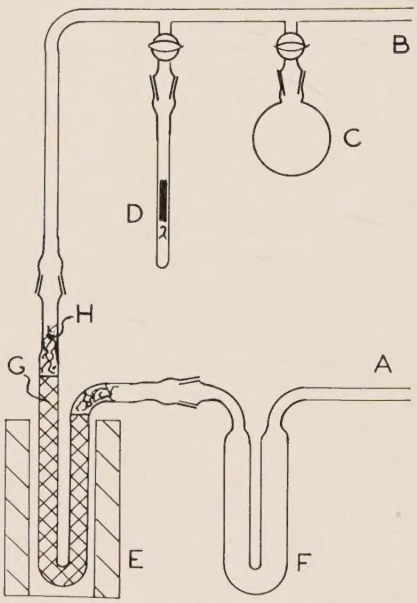
[3] D. F. Cole, in preparation.

[4] W. J. O'Connor, Quart. J. exper. Physiol. *40*, 237 (1955). – D. F. Cole, Acta endocrin. (Kbh) *19*, 397 (1955).

## PRO LABORATORIO

### Preparation of Radioactive Water

Because of the relatively low cost of hydrogen-3 (tritium) this radioactive isotope is being used in increasing amounts as a tracer. Water is one of the most useful compounds containing this element, not only for biological experimentation but also for chemical syntheses of other compounds. We present a method used for the preparation of tritiated water in our Laboratory in connection with our investigations of organic reactions by means of the isotope effect[1]. This method gives good yields based on radioactivity, is adaptable to any quantity of tritium, requires little special equipment, and is free of hazards. Other methods for the preparation of tritiated water from tritium gas have been reported[2], but these have disadvantages which are not shown by the method presented here. We do not claim that this method is original with us, but we feel that its publication will be helpful to others who wish to prepare tritiated water.




Apparatus for the preparation of tritiated water. *A*, intake of Toeppler pump; *B*, outlet of Toeppler pump; *C*, flask containing 1-3 ml of ordinary water; *D*, ampoule holding tritium, and a magnet; *E*, furnace; *F*, cold-trap; *G*, copper-oxide wire; *H*, glass wool.

*Experimental.*—A diagram of the apparatus used is shown in the Figure. The essential parts of the apparatus are: a container holding 1–3 ml of water (*C*), an ampoule containing tritium gas (*D*) to which has been added a cylindrical magnet, a heater (*E*) capable of reaching 300–350°, containing a U-tube packed with copper oxide wire which is held in place with glass wool, and a U-tube (*F*) which can be cooled to – 80° for the condensation of water. The apparatus is connected to a Toeppler pump for the circulation of hydrogen through the apparatus from *B* to *A*.

After the apparatus is evacuated and free of leaks, the furnace containing copper oxide wire is heated to 300°, the trap is cooled with solid carbon dioxide or nitrogen-toluene mush, and the bulb of the Toeppler pump is filled with hydrogen at a pressure of one-half an atmosphere. To start the reaction, the break-off seal on the ampoule of tritium is broken by means of the magnet, allowing tritium to expand into the evacuated space. The action of the Toeppler pump is started, diluting the tritium with hydrogen gas and pushing it through the heated copper oxide. The circulating action of the Toeppler pump is continued until the pressure in the apparatus drops to a few microns of mercury, indicating complete transformation of the tritium-hydrogen mixture to water. The Toeppler bulb may be filled again with hydrogen and this allowed to react as before. The furnace is allowed to cool and the stopcock on the container of water is opened. 1–3 ml of water is distilled through the line and furnace, in order to displace radioactive water which has been adsorbed on the walls. This part of the procedure is very important in getting good activity yields as all of the radioactive water might be lost by adherence to the solid surfaces.

In one experiment tritium gas from an ampoule thought to contain 100 mc was mixed with hydrogen and oxidized with copper oxide to water which was further diluted. The final weight of the water was 14·44 g with an activity of 7·13 mc/g, or a total radioactivity yield of 103 mc. Evidently the activity of the starting material was more than 100 mc; however all runs have shown consistently good yields, averaging about 70% based on starting activity. The resulting water can be obtained at very high specific activities by using less water for transference and dilution.

E. M. Hodnett, Ch. F. Feldman and J. J. Flynn, Jr.

*Department of Chemistry, Oklahoma Agricultural and Mechanical College, Stillwater, Oklahoma, October 30, 1956.*

*Zusammenfassung*

Radioaktives Wasser wird mit Sicherheit und mit guter Ausbeute dargestellt, indem man über Kupferoxyd bei 300–350° eine Tritium-Wasserstoffmischung streichen lässt.

[1] This work is supported by the United States Atomic Energy Commission under Contract No. AT(11-1)-71, Project No. 5, and is being done in the Radioisotopes and Radiations Laboratory, Research Foundation, Oklahoma A. and M. College.

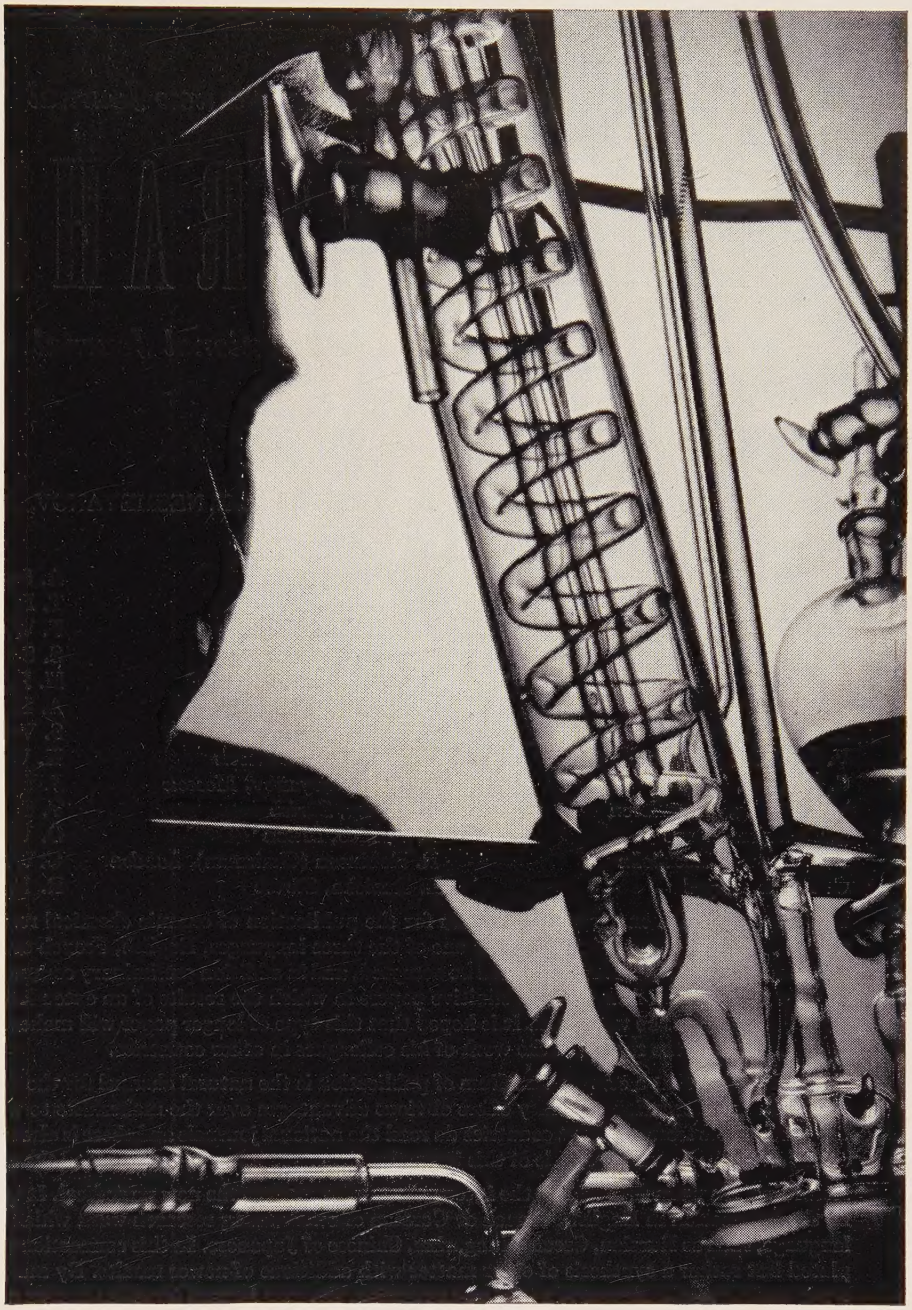
[2] R. F. Glascock, *Isotopic Gas Analysis for Biochemists* (Academic Press Inc., New York 1954), p. 203.

## NOVA

### Journal of Insect Physiology

The aim of the journal is to bring together in one place the best contributions on insect physiology from all parts of the world. It will be concerned also with the physiology of other groups of arthropods, especially of terrestrial forms. Original work on biochemistry, toxicology, and the functional aspects of morphology, as well as papers on new techniques and methods, will be published if it contributes to the solution of physiological problems. Preference will be given to papers that contribute to an understanding of the general principles underlying the physiology of insects.

Papers in English, French or German should be submitted to the appropriate editor: Prof. V. G. Dethier, Department of Biology, The John Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA.; Dr. H. E. Hinton, Department of Zoology, University of Bristol, Bristol, England; Prof. M. Lüscher, Zoologisches Institut der Universität Bern, Bern, Switzerland.



S A N D O Z - Präparate

basieren auf eigenen chemischen

und pharmakologischen Forschungen

sowie weltweiter klinischer

Erfahrung.

SANDOZ

*Announcing a new Journal*

# TETRAHEDRON

*The International Journal of Organic Chemistry*


*Executive Editor* H. STEPHEN, *London*

*Honorary Regional Editors*

M. S. KHARASCH, *Chicago* R. H. MARTIN, *Brussels* A. N. NESMEYANOV, *Moscow* F. WEYGAND, *Berlin*

*Honorary Editorial Advisory Board*

O. Achmatowicz, *Warsaw*
K. Balenovic, *Zagreb*
P. D. Bartlett, *Chicago*
E. Berner, *Oslo*
L. H. Briggs, *Auckland*
H. C. Brown, *Lafayette*
R. Delaby, *Paris*
V. Deulofeu, *Buenos Aires*
C. Djerassi, *Detroit*
W. Doering, *New Haven*
C. Dufraisse, *Paris*
H. Erdtman, *Stockholm*
G. Fodor, *Szeged*
D. Ginsburg, *Haifa*
E. Havinga, *Leiden*
B. Helferich, *Bonn*
P. Karrer, *Zürich*
M. S. Kharasch, *Chicago*
R. P. Linstead, *London*
L. Marion, *Ottawa*
R. H. Martin, *Brussels*
A. N. Nesmeyanov, *Moscow*
V. Prelog, *Zürich*
A. Quilico, *Milan*
R. Robinson (Chairman), *London*
L. Ruzicka, *Zürich*
A. Sandoval, *Mexico*
T. R. Seshadri, *Delhi*
F. W. Shoppee, *Sydney*
S. Sugasawa, *Tokyo*
M. L. Tamayo, *Madrid*
A. R. Todd, *Cambridge*
S. Veibel, *Copenhagen*
K. Venkataraman, *Bombay*
J. Wessely, *Vienna*
T. S. Wheeler, *Dublin*
O. Wichterle, *Prague*
G. Wittig, *Heidelberg*
R. B. Woodward, *Cambridge, U.S.A.*


This new journal is envisaged as a forum for the publication of organic chemical research work from all parts of the world. Contributions will be printed in one of the three languages, English, French or German. Original memoirs of an experimental or theoretical nature will be accepted, and in addition preliminary communications and short presentations of stimulating ideas. Longer and definitive papers in which the results of an extended investigation are presented in a unified fashion will be welcomed. It is hoped that this type of longer paper will make it easier for the reader to become acquainted with the results of the work of his colleagues in other countries.

It is considered that a common medium of publication is the natural channel for the flow of ideas and that when available such an international facility offers obvious advantages over the makeshifts to which we are accustomed. Admittedly, scientists from different countries do read the national journals and there is already an extensive exchange of ideas on a private basis. Thus the role of this journal will be to supplement and extend the existing means of communication.

Accordingly, emphasis is laid on the international character of the new periodical. It is hoped that a special feature will be the publication in English, French or German of outstanding research work which has already appeared in another language, such as Russian, Czech, Hungarian, Chinese of Japanese. In this connection mere translations are not contemplated but rather a synthesis of older matter with additions of newer results. By making more generally available the work and ideas of colleagues in different countries, the new journal hopes to render a service to international collaboration in organic chemistry.

«Tetrahedron» is intended to cover all aspects of organic chemistry, whether theoretical or practical, analytic or synthetic, physical or biological. Papers on applied chemistry which have a pure organic chemical content will be acceptable.

TETRAHEDRON *will be published quarterly, with four issues to the volume. Publication will commence early in 1957.*

SUBSCRIPTION RATE

(A) £6 (U.S.A. $17) per volume (postage included) for institutes, libraries, firms, government offices and similar organisations.

(B) £3 10s. (U.S.A. $9.80) per volume (postage included) for individual subscribers certifying that they require the journal for their private use only.


PERGAMON PRESS London New York Paris

4 & 5, Fitzroy Square, London, W. 1. 122, East 55th Street, New York 22, N. Y.
24, Rue des Écoles, Paris V^e^.